



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Deteção de infeção não patente com *Schistosoma haematobium* em populações de *Bulinus* sp como factor de risco para a schistosomose urinária na província da Zambézia, Moçambique

Luis Bernardo Bogaio Constantino

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRADO EM PARASITOLOGIA
MÉDICA**

OUTUBRO, 2018



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Deteção de infeção não patente com *Schistosoma haematobium* em populações de *Bulinus* sp como fator de risco para a schistosomose urinária na província da Zambézia, Moçambique

Autor: Luís Bernardo Bogaio Constantino

Orientadora: Professora Doutora Isabel Maurício

Coorientador: Doutor Pedro Ferreira

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau Mestre em Parasitologia Médica

Apoio financeiro por Instituto de Camões em parceria com governo de Moçambique

Dedicatória

Aos meus pais

Bernardo Constantino e Francisca Bogaio

Aos meus irmãos

António, Gilberto, Hélder, Palmira e Joaquim

Às minhas sobrinhas

Amy e Mya

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a Deus pelo Dom da vida e da sabedoria, por nos mostrar que só realizamos aquilo que ele deseja.

Esse trabalho é fruto do culminar de um processo de aprendizagem e desenvolvimento pessoal, o qual não seria possível sem o apoio e o incentivo de algumas pessoas, a quem devo de coração reconhecimento e um sincero agradecimento.

À minha orientadora **Professora Doutora Isabel Maurício** e coorientador **Doutor Pedro Ferreira**, pela sua importante contribuição, amizade, confiança e paciência, que foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho de conclusão do curso.

A Camões - Instituto da Cooperação e da Língua Portugal, agradeço a bolsa concedida, sem a qual não teria sido possível a realização deste curso de mestrado.

A todos os docentes e colegas do mestrado que me deram tanta força e coragem.

Um agradecimento muito especial à minha família, aos meus pais e aos meus irmãos, a quem eu tenho como espelho da minha vida. Grande parte daquilo que sou hoje, a eles o devo, através dos valores morais, ensinamentos e forças que me transmitiram ao longo da vida.

Para terminar gostaria de agradecer a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para minha formação académica.

Resumo

A schistosomose urinária é a forma mais prevalente de schistosomose em humanos, e é causada pelo tremátode *Schistosoma haematobium*. Pode resultar em graves patologias urinárias e genitais. É altamente endêmico em Moçambique, mas os programas de controlo tiveram um sucesso limitado e os hospedeiros intermediários têm sido pouco estudados. Um inquérito na Província da Zambézia tinha encontrado uma prevalência de *S. haematobium* em crianças de 73%, através de filtração de urina e PCR. A prevalência de infeção nos hospedeiros intermediários dos caracóis coletados, *Bulinus* sp, em Gurué tinha sido de 1,9 a 7,7%, respetivamente no rio Mutxora e Barragem, pelo teste de eliminação de cercárias.

O objetivo deste estudo foi determinar a taxa de infeção não patente de *Bulinus* sp e caracterizar e comparar as populações de caracóis em Gurué.

O DNA foi extraído da massa cefalopodal e do hepatopâncreas de 105 caracóis de dois locais (Barragem e rio Mutxora), provenientes de grupos sem libertação de cercárias. A qualidade do DNA foi avaliada por amplificação e sequenciamento de ITS2 e COI para confirmar a espécie de *Bulinus*. O DNA de parasita foi detetado por PCR da região repetitiva DraI e PCR multiplex (simples e nested) de COI.

As duas populações de caracóis apresentaram diversidade genética entre si em ITS2 e COI e foram filogeneticamente mais semelhantes entre si e a sequências de *Bulinus globosus* da Tanzânia. A PCR DraI teve uma sensibilidade de 89 % na deteção do parasita. A taxa de prevalência pré-patente determinada por PCR de DraI foi de 0 e 17 %, respetivamente, para o rio Mutxora e a Barragem, sendo que nesta última foi de 13 % para região cefalopodal e 4 % hepatopâncreas. As taxas de infeção maiores na massa cefalopodal, sugerem infeções recentes. Por PCR multiplex e sequenciação de COI confirmou-se a presença de apenas *S. haematobium*.

Estes resultados mostram que a infeção não patente de moluscos nesta região pode ser muito maior do que o esperado a partir da eliminação de cercárias, com uma alta taxa de infeções recentes. A deteção de infeção do hospedeiro intermediário por métodos moleculares é, portanto, importante em levantamentos epidemiológicos e monitorização de programas de controle em Moçambique.

Palavras chaves: Schistosomose urinária, *Schistosoma haematobium*, *Bulinus* sp, DraI, ITS, COI

Abstract

Urinary schistosomiasis is the most prevalent form of schistosomiasis in humans, and it is caused by the trematode *Schistosoma haematobium*. It can result in severe urinary and genital pathologies. It is highly endemic in Mozambique, but control programs have had limited success and intermediate hosts have been poorly studied. A survey in the Province of Zambézia had found a prevalence of *S. haematobium* in children of 73%, through urine filtration and PCR. The prevalence of infection in the snail intermediate hosts collected, *Bulinus* sp, in Gurué had been 1.9 to 7.7%, respectively in the Mutxora River e Barragem, by the cercarial elimination test.

The objective of this study was to determine the non-patent infection rate of *Bulinus* sp and to characterize and compare the snail populations in Gurué

DNA was extracted from the cephalopodal mass and hepatopancreas of 105 snails from two sites (Barragem and Mutxora River) from groups without cercarial release. DNA quality was assessed by amplification and sequencing of ITS2 and COI to confirm the *Bulinus* species. Parasite DNA was detected by PCR of the repetitive region DraI and multiplex PCR (simple and nested) of COI.

The two snail populations showed genetic diversity between each other in ITS2 and COI and were phylogenetically more similar to each other and to the sequences of *Bulinus globosus* from Tanzania. The DraI PCR had a sensitivity of 89% for parasite detection. The pre-patent prevalence rate was 0 and 17%, respectively, for the Mutxora River and Barragem, and in the latter it was 13% for the cephalopodal region and 4% for the hepatopancreas. The higher infection rates in the cephalopodal mass suggest recent infections. Multiplex PCR and sequencing of COI confirmed the presence of only *S. haematobium*.

These results show that the non-patent infection of snails in this region may be much higher than expected from the elimination of cercariae alone, with a high rate of recent infections. Detection of host infection by molecular methods is, therefore, important in epidemiological surveys and monitoring of control programs in Mozambique.

Key words: Urinary schistosomiasis, *Schistosoma haematobium*, *Bulinus* sp, DraI, ITS, COI

Índice	
Dedicatória.....	I
Agradecimentos	II
Resumo	III
Abstract.....	IV
Lista de abreviaturas.....	VIII
Capítulo 1 - Introdução.....	1
1. Introdução	2
1.1. Schistosomose	2
1.1.1. Considerações gerais.....	2
1.2. Situação epidemiológica da schistosomose no mundo	3
1.3. Parasita	5
1.3.1. Classificação do parasita.....	5
1.3.2. Biologia.....	6
1.3.3. Hospedeiro intermediário (Moluscos)	7
1.3.3.1. Classificação sistemática de <i>Bulinus</i> sp hospedeiro intermediário de <i>S. haematobium</i>	8
1.3.3.2 Género <i>Bulinus</i>	8
1.3.4. Ciclo de vida do parasita <i>S. haematobium</i>	8
1.3.5. Interação parasita hospedeiro.....	10
1.4. Manifestações clínicas.....	11
1.5. Diagnóstico laboratorial.....	12
1.5.1. Métodos parasitológicos ou diretos	12
1.5.2 Métodos imunológicos ou indiretos.....	13
1.5.3. Métodos moleculares	14
1.6. Técnicas de biologia molecular utilizadas no estudo dos moluscos	15
1.6.1. Marcadores ribossomais	16
1.6.2. Marcadores mitocondriais.....	16
1.7. Tratamento.....	17
1.8. Prevenção e controlo	18
1.9. Schistosomose em Moçambique.....	18
1.9.1. Caracterização geográfica de Moçambique	20

Capítulo 2 - Objetivos.....	23
Capítulo 3 - Materiais e métodos.....	25
3.1. Descrição da área do estudo.....	26
3.2. Amostra.....	27
3.3. Análises moleculares.....	27
3.3.1. Extração do DNA genómico de <i>Bulinus</i> sp.....	27
3.3.2. Caracterização de <i>Bulinus</i> sp.....	28
3.3.2.1. Amplificação da Região Interna Transcrita (ITS) do DNA ribossomal.....	28
3.3.2.2. Amplificação do gene para citocromo oxidase c (COI).....	29
3.3.3. Detecção e caracterização molecular de infeção por <i>S. haematobium</i> em <i>Bulinus</i>	29
3.3.3.1. Amplificação de região repetitiva Dra I	29
3.3.3.2. PCR Multiplex de COI.....	30
3.3.3.3. Desenvolvimento e aplicação de nested-PCR Multiplex de COI.....	31
3.4. Electroforese.....	32
3.5. Sequenciação de DNA.....	32
3.6. Análises de sequências e filogenia.....	32
3.7. Análise estatística.....	33
Capítulo 4 - Resultados.....	35
4. Resultados.....	36
4.1. Extração de DNA.....	36
4.2. Caracterização molecular de <i>Bulinus</i> sp.....	36
4.2.1. Amplificação de ITS.....	36
4.2.2 Amplificação do gene COI da região DNA mitocondrial	37
4.2.3. Análise filogenética de <i>Bulinus</i> sp.....	38
4.3. Detecção e caracterização molecular de infeção por <i>S. haematobium</i> em <i>Bulinus</i>	42
4.3.1. Amplificação de região repetitiva Dra I.....	42
4.3.2. PCR Multiplex de COI.....	43
4.3.3. Nested PCR multiplex de COI.....	44
4.3.4. Análise filogenético de <i>S. haematobium</i>	46
Capítulo 5 - Discussão e conclusão	49

5.1. Discussão.....	50
Referências Bibliográficas	56
Anexos.....	63
Anexo 1	64
Anexo 2	73
Anexo 3	74

Lista de abreviaturas

COI - Citocromo oxidase subunidade I

CTAB - Brometo de cetiltrimetilamónia

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucleico

ELISA - Ensaio de imunoabsorção enzimática

IHMT - Instituto de Higiene e Medicina Tropical

ITS - Espaçador transcrito interno

min - Minuto

PCR - Reação em cadeia da polimerase

RNA - Ácido ribonucleico

rpm - Rotações por minuto

SNP - Polimorfismo de nucleótido único

Capítulo 1- Introdução

1. Introdução

1.1. Schistosomose

1.1.1. Considerações gerais

A schistosomose ou bilharziose foi identificada pela primeira vez pelo médico alemão Theodor Bilharz em 1852, que descreveu um parasita intravascular, encontrado durante a necrópsia de um rapaz, e ao qual deu o nome de *Distomum haematobium*. Posteriormente, Weinlande (1858) denominou o género deste helminta de *Schistosoma*, sendo esta designação aceite até hoje (Neves *et al.*, 2011).

A schistosomose é uma doença parasitária, causada por trematodes digenéticos do género *Schistosoma*. Os humanos atuam como hospedeiro definitivo do parasita, enquanto algumas espécies de moluscos de água doce desempenham o papel de hospedeiros intermediários (Singh *et al.*, 2016).

Existem, em todo o mundo, seis espécies de *Schistosoma* que foram descritas como causando doença em humanos: *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma intercalatum*, *Schistosoma mekongi* e *Schistosoma guineensis* (Cantanhede *et al.* 2008), tendo cada espécie uma distribuição bem definida, o que é importante para diagnóstico da doença. Dentro destas espécies, *S. haematobium*, *S. mansoni* e *S. japonicum* são as mais importantes, visto serem responsáveis por mais de 95% de todos os casos humanos de schistosomose (Mutapi *et al.*, 2006). Cada espécie está associada a um hospedeiro intermediário específico (Tabela 1), gastrópodes de água doce, de modo que a distribuição do parasita está condicionada à distribuição do molusco.

O grupo de *S. haematobium* é constituído por oito espécies próximas entre si: *S. haematobium*, *S. intercalatum*, *S. guineensis*, *S. bovis*, *S. curassoni*, *S. mattheei*, *S. leiperi* e *S. margrebowiei*, dos quais as três primeiras espécies têm o ser humano como hospedeiro definitivo e as restantes têm animais ruminantes e domésticos (Kane *et al.*, 2008). Todas estas espécies têm caracóis do género *Bulinus* como hospedeiro intermediário e ovos com esporão terminal proeminente, com exceção de *S. margrebowiei* (Kane e Rollinson, 1994), no qual o esporão é vestigial. De notar que híbridos entre algumas destas espécies têm sido encontradas, em países africanos, mas

também na Europa (Córsega), como por exemplo entre *S. haematobium* e *S. bovis* em França (Boissier *et al.*, 2015) e no Senegal (Boon *et al.*, 2017).

Schistosoma mattheei é a única espécie zoonótica descrita até hoje em Moçambique (Pitchford, 1977). O único estudo epidemiológico encontrado sobre schistosomose bovina neste país indica que a região sul tem maior taxa de prevalência do que os autores indicam ser *S. bovis*, como espécie responsável pela schistosomose bovina em África (Botelho *et al.*, 2016).

Algumas mudanças ambientais provocadas pela ação humana podem ter repercussões na transmissão da schistosomose. Assim, a construção de barragens para produção de energia e a expansão da irrigação de campos agrícolas podem aumentar o número de possíveis habitats dos moluscos hospedeiros intermediários. Por este motivo, a prevalência e incidência da schistosomose têm vindo a aumentar a nível mundial (Tierney *et al.*, 2005, citado por Singh *et al.* 2016), havendo expansão de endemicidade até para países de alto rendimento e com bom saneamento básico, tais como a França, Alemanha e Itália (Boissier *et al.*, 2015; Berry *et al.*, 2014).

Tabela 1. Distribuição geográfica do parasita e hospedeiro intermediário

Parasita (Espécie)	Hospedeiro intermediário	Distribuição geográfica
<i>S. haematobium</i>	<i>Bulinus</i> spp	África, Médio Oriente, Córsega (França)
<i>S. mansoni</i>	<i>Biomphalaria</i> spp	África, Médio Oriente, Caraíbas, Brasil, Venezuela e Suriname
<i>S. japonicum</i>	<i>Oncomelania</i> spp	China, Indonésia e Filipinas
<i>S. mekongi</i>	<i>Neotricula aperta</i>	Camboja e República Democrática Popular do Laos
<i>S. guineensis</i> e <i>S. intercalatum</i>	<i>Bulinus</i> spp	África Central

1.2. Situação epidemiológica da schistosomose no mundo

Segundo a Organização mundial de saúde (OMS), a schistosomose é a segunda parasitose com maior impacte na saúde pública, a seguir à malária. É endémica em 76

países de África, América do Sul, Mediterrâneo Oriental e Ásia (Azinhais *et al.*, 2009; Engels *et al.*, 2002; Barroso *et al.*, 2014).

Apesar da distribuição da schistosomose ter sofrido alterações nos últimos 50 anos, e de ter havido projetos de controlo com algum sucesso, o número de pessoas infetadas ou em risco de infeção não diminuiu (Chitsulo *et al.*, 2000). Estima-se que 239 milhões de pessoas estão infetadas (Bustinduy e King, 2014), dos quais 120 milhões são sintomáticos e 20 milhões com doença grave (Adenowo *et al.*, 2015) e que haja mais de 600 milhões de pessoas em risco de infeção em todo mundo (Chitsulo *et al.*, 2000), a grande maioria (90%) na África subsariana.

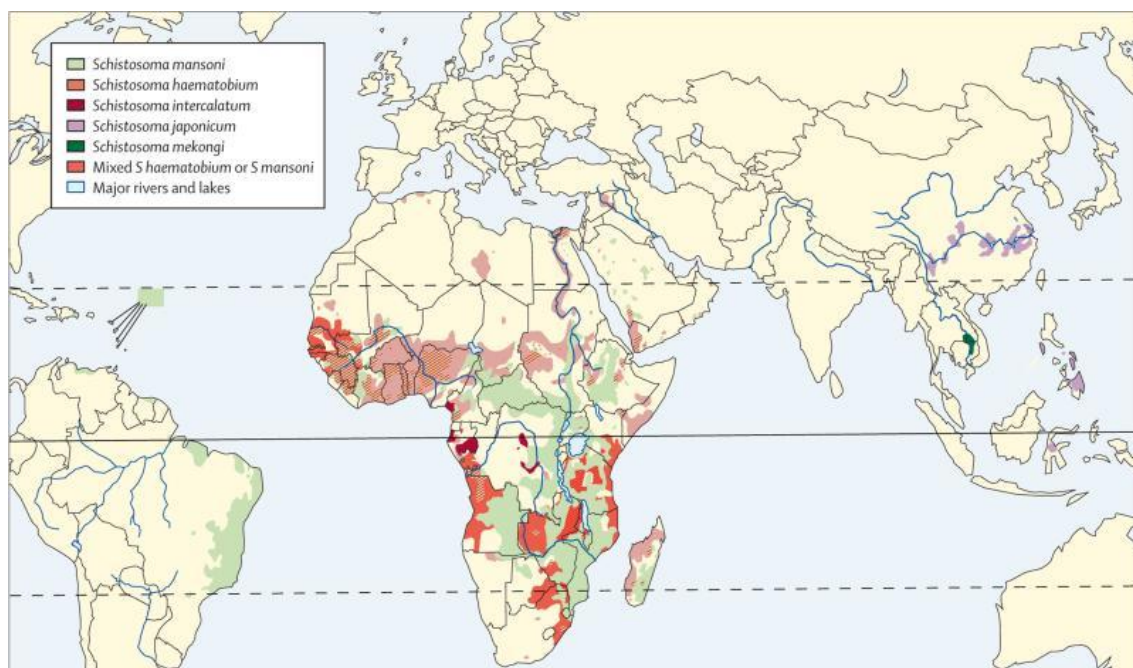


Figura 1. Distribuição mundial da schistosomose humana. Fonte: Colley *et al.*, 2014.

A schistosomose causada por *S. mansoni* encontra-se distribuída por 54 países, que vão desde a Península Arábica, em toda a África e em Madagáscar (Bustinduy e King, 2014). Na América do Sul, é endémica no Brasil e na Venezuela, Suriname e várias ilhas das Caraíbas. A espécie *S. haematobium* é endémica em 54 países do continente africano, Médio Oriente, ilhas do Oceano Índico, como Madagáscar, Zanzibar, Pemba, e na França (Córsega). Cerca de 41 países tem co-infeção *S. haematobium* e *S. mansoni* (Barroso *et*

al., 2014; Bustinduy e King, 2014). A schistosomose causada por *S. intercalatum* e *S. guineensis* é endêmica em cerca de 10 países da África Central. *Schistosoma japonicum* é encontrado na China, Indonésia e nas Filipinas enquanto que *S. mekongi* parece estar restrito à República Democrática Popular do Laos e Camboja.

1.3. Parasita

1.3.1. Classificação do parasita

A classificação sistemática dos parasitas do género *Schistosoma* que causam a schistosomose humana, de acordo com Webster *et al.* (2006), é a seguinte:

Reino Animal

Filo Platyhelminthes

Classe Trematoda

Subclasse Digenea,

Ordem Strigeiformes

Família Schistosomatidae

Sub Família Schistosomatinae

Género *Schistosoma*.

Espécies *Schistosoma haematobium*, Bilharz (1851)

Schistosoma mansoni, Sambon (1907)

Schistosoma japonicum, Katsurada (1904)

Schistosoma intercalatum, Fisher (1934)

Schistosoma mekongi, Voge, Bruckner e Bruce (1978).

Schistosoma malayensis, Greer, Ow-Yang e Yong (1988)

1.3.2. Biologia

Os parasitas do género *Schistosoma* são, na sua forma adulta, visíveis macroscopicamente. São dióicos (isto é, com sexos separados), de cor branca ou acinzentada, e possuem duas ventosas, uma oral e outra ventral, um tegumento complexo, um aparelho digestivo cego e órgãos reprodutivos (Figura 2) (Gryseels *et al.* 2006; Neves *et al.* 2011; Gryseels. 2012; Luis Reys. 2010). Apresentam corpo cilíndrico (fêmeas) ou achatado e dobrado longitudinalmente sobre si mesmo (machos) e medem entre 1 cm e 1,6 cm de comprimento. Vivem na corrente sanguínea do hospedeiro humano, preferentemente no plexo vesical da bexiga no caso de *S. haematobium* e veias mesentéricas (outras espécies de *Schistosoma*), onde podem sobreviver, em média, 3 a 5 anos, embora haja casos registados com mais de 30 anos (Gryseels *et al.*, 2006). Alimentam-se de sangue e globulinas através da glicólise anaeróbia, que digerem num trato intestinal cego, sendo os detritos regurgitados para a corrente sanguínea humana.

As fêmeas de *Schistosoma* spp são mais longas e delgadas que os machos (1,6 cm de comprimento). Apresentam o tegumento liso e apresentam uma cor mais escura e acinzentada devido à presença de um pigmento derivado da digestão do sangue (hemozoína) (Neves *et al.* 2011; Reys. 2010).

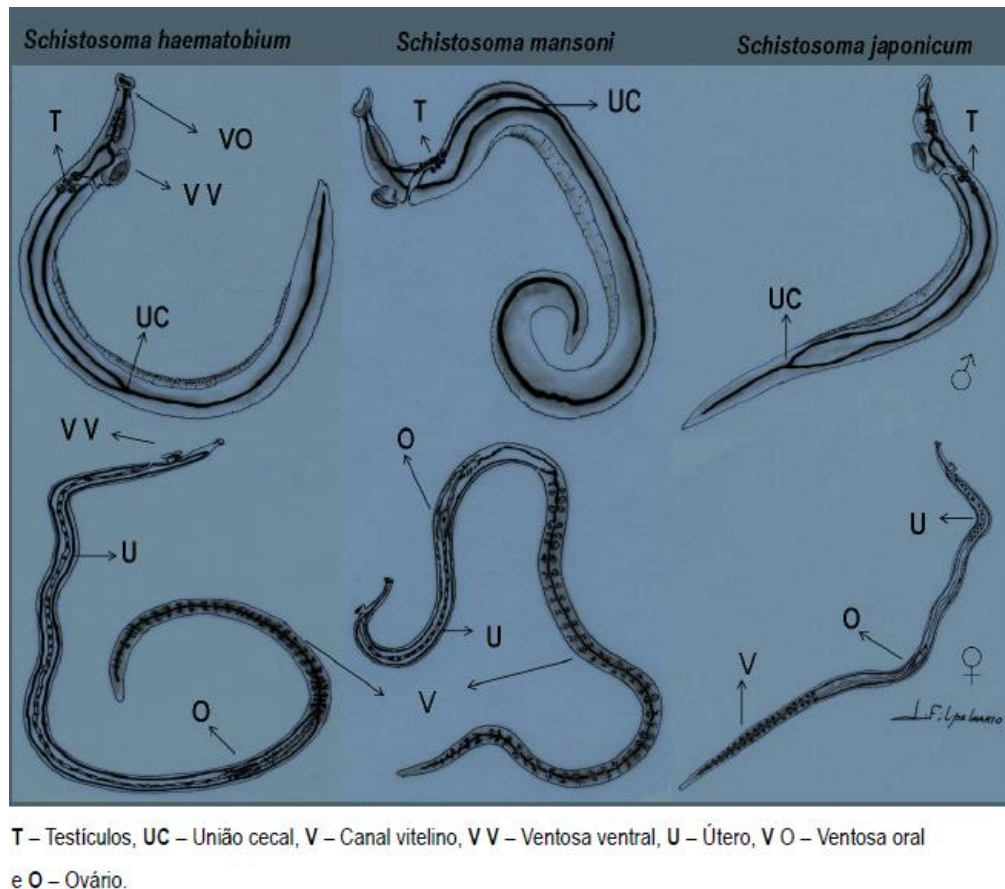


Figura 2. Morfologia comparada do parasita adulto *S. haematobium*, *S. mansoni* e *S. japonicum*. Fonte: Ferreira. 2004

1.3.3. Hospedeiro intermediário (Moluscos)

Os moluscos (Filo Mollusca = *L. mollis* = mole) constituem um grupo de animais que apresenta grande diversidade, tanto em ambientes aquáticos quanto terrestres (Lucas e Santos, 2016). Trata-se do segundo maior filo em todo reino animal, sendo suplantado apenas pelos artrópodes (Filo Arthropoda), que possuem algo perto de 1 milhão de espécies (Lucas e Santos, 2016). Quanto ao número de espécies conhecidas cientificamente, estima-se cerca de 150.000, estando cerca de 80.000 incluídas na Classe Gastropoda (Malek e Cheng, 1974), a qual inclui os caracóis. Os caracóis de água doce têm relevância na medicina por serem um hospedeiro intermediários de tremátodes, incluindo as espécies do gênero *Schistosoma*. Existe uma relação específica entre a

espécie de *Schistosoma* e de caracóis de água doce (Exemplos: molusco do género *Bulinus* e *S. haematobium*).

1.3.3.1 Classificação sistemática de *Bulinus* sp hospedeiros intermediários de *S. haematobium*

A classificação sistemática dos caracóis transmissores de *S. haematobium* é a seguinte:

Filo Mollusca

Classe Gastropoda

Subclasse Pulmonata

Ordem Basommatophora

Família Planorbidae

Subfamília Bulininae

Género *Bulinus*, Muller (1781)

1.3.3.2 Género *Bulinus*

Segundo Adenowo *et al.* (2015), os moluscos do género *Bulinus* são hospedeiros intermediários de *S. haematobium*. Este género de moluscos compreende atualmente 37 espécies de *Bulinus*, as quais estão divididas em quatro grupos, nomeadamente: complexo de *Bulinus tropicus*/ *Bulinus truncatus*, grupo de *Bulinus forskalli*, grupo de *Bulinus reticulatus* e *Bulinus africanus* (Akinwale *et al.*, 2011). A presença destas espécies é determinante na transmissão da schistosomose.

1.3.4 Ciclo de vida do parasita *S. haematobium*

De uma maneira geral, o ciclo de vida dos parasitas do género *Schistosoma* (Figura 3) é idêntico, diferindo sobretudo nos hospedeiros intermediários e na localização dos adultos (Tabela 1). O parasita necessita de dois hospedeiros para completar o ciclo evolutivo, nomeadamente, o hospedeiro definitivo (Humano e/ou outros mamíferos) e hospedeiro intermediário (moluscos de água doce) (Junior *et al.*, 2013).

Os ovos são eliminados com as fezes (*S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. mekongi* e *S. intercalatum*) ou urina (*S. haematobium*). Quando entram em contato com água doce, dá-se a eclosão dos miracídios. Estes, por sua vez, permanecem viáveis por aproximadamente 48 horas (Gryseels *et al.*, 2006) até encontrar moluscos específicos. Depois do miracídio penetrar nos tecidos do molusco, transforma-se num novo tipo larvar denominado esporocisto, e depois em larvas infetantes para os hospedeiros definitivos, com uma cauda bifurcada típica, que recebem o nome de cercárias (Rey, 2010).

As cercárias são eliminadas pelos moluscos e vivem no meio aquático durante aproximadamente 2 dias (36 a 48 horas), mas a sua maior atividade e capacidade infectante ocorrem nas primeiras 8 horas. Nas coleções de água doce, nadam ativamente até encontrar o seu hospedeiro definitivo específico. Assim que as cercárias alcançam a pele do hospedeiro definitivo, fixam-se preferentemente entre os folículos pilosos com o auxílio das duas ventosas e de uma substância mucoproteica secretada por suas glândulas acetabulares, e penetram ativamente na pele graças aos movimentos ativos (Neves *et al.*, 2011). Este processo de penetração dura aproximadamente 5 a 15 minutos.

Após a penetração, cada cercária que consegue sobreviver, perde a cauda bifurcada e transforma-se na última forma larvar do parasita, o *schistosômulo*, que migra para os pulmões até alcançar o sistema porta intra-hepático, onde completa o seu desenvolvimento e atinge a maturidade sexual (Barroso *et al.* 2014). Depois do acasalamento, os parasitas adultos migram contra a corrente sanguínea, no sistema porta, terminando nas vénulas e capilares dos plexos hemorroidários e vesicais, tributário do sistema porta ou da veia cava inferior (consoante a espécie), onde as fêmeas iniciam a postura dos ovos aproximadamente dois meses após infecção inicial.

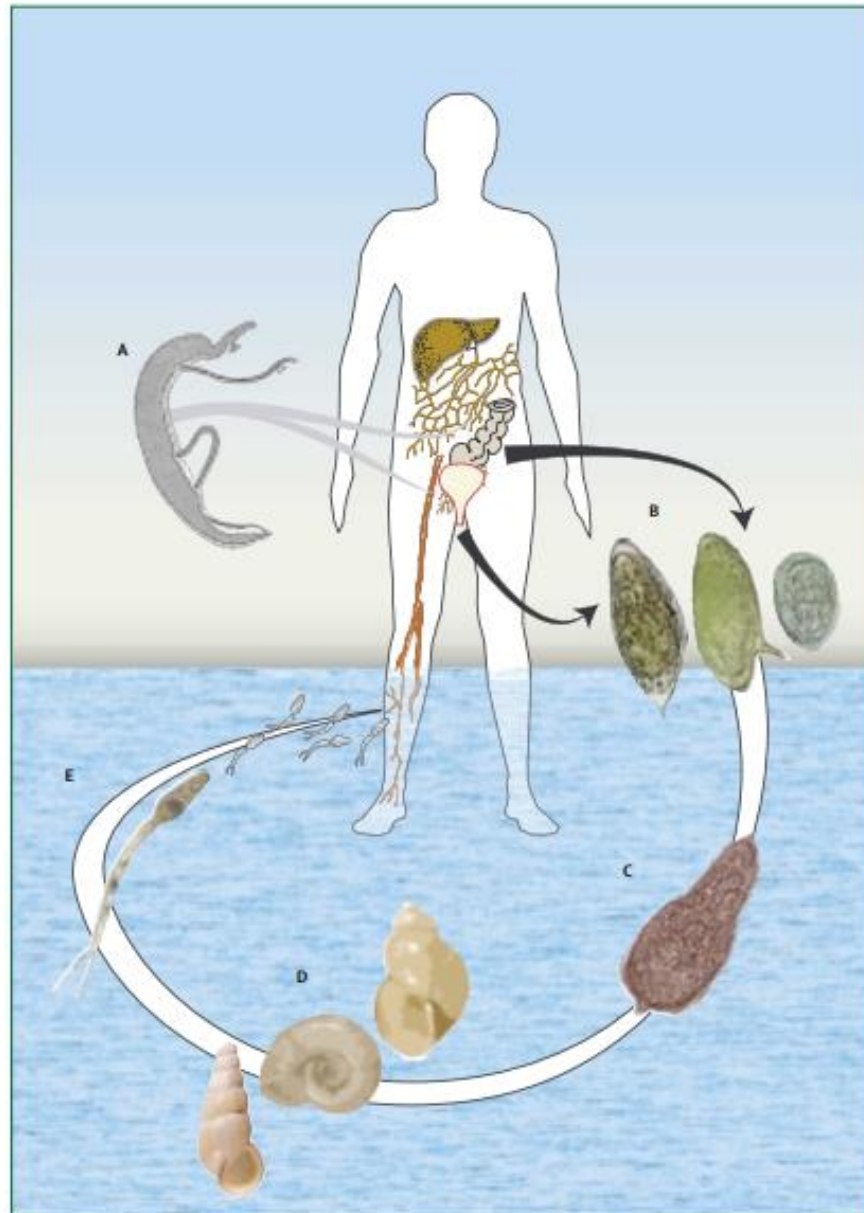


Figura 3. Ciclo de vida do parasita. A: parasita adulto. B: ovos de *S. haematobium*, *S. mansoni* e *S. japonicum*, respetivamente da esquerda para a direita. C: miracídio. D: hospedeiros intermediários (caracol) dos géneros *Oncomelania*, *Biomphalaria* e *Bulinus*, respetivamente da esquerda para a direita. E: cercárias. Fonte: Gryseels *et al.*, 2006.

1.3.5 Interação parasita hospedeiro

Para Salzet e Stefano (2000), a relação parasita hospedeiro é baseada na interação complexa entre as estratégias de sobrevivência do parasita e os mecanismos de defesa do hospedeiro. De acordo com King *et al.* (2001), esta interação complexa entre o hospedeiro

e o parasita promove o equilíbrio e permite a transmissão contínua do parasita sem causar danos nocivos imediatos ao hospedeiro. O parasita apresenta mecanismos sofisticados de evasão ao sistema imunitário do hospedeiro definitivo, o que lhe permite habitar os vasos do sistema circulatório por longos períodos. Uma das formas de evasão envolve a expressão de antigénios de superfície, interferência do parasita na síntese de citocinas através da indução da apoptose de células de defesa do hospedeiro e modificação da resposta imune ao parasita por interferência com o sistema hormonal através de receptores do próprio parasita (Chen *et al.*, 2000; Salzet e Stefano, 2000; Angeli *et al.*, 2001).

1.4 Manifestações clínicas

De um modo geral, os sintomas da schistosomose são vários e dependem da fase da infeção e das espécies do parasita. A fase aguda da doença ocorre desde a penetração de cercárias através da pele, com predominância de reações alérgicas, incluído alterações dermatológicas (como por exemplo a dermatite cercariana) (Júnior *et al.*, 2013).

Quatro a seis semanas após a infeção, coincidindo com o início da deposição dos ovos nos tecidos, ocorre uma resposta imunológica através da formação de imunocomplexos (Barroso *et al.*, 2014). Clinicamente, caracteriza-se por febre (febre de Katayama), linfadenopatias, hepatosplenomegalia, cefaleia, anorexia, dor abdominal, eosinofilia, fadiga e mal-estar (Barroso *et al.*, 2014; Junior *et al.*, 2013)

A fase crónica da schistosomose urinária, caracteriza-se por disúria, polaquiúria, proteinúria, hematúria terminal ou total, que pode causar deficiência de ferro, consequentemente dando origem a anemia ferropénica (Gryseels *et al.*, 2006; Barroso *et al.*, 2006). Em regiões endémicas a hematúria é frequente. Às vezes este sintoma é confundido com a menstruação nas meninas e sinal da puberdade para meninos em algumas regiões africanas (Colley *et al.*, 2014). Os indivíduos com um estado avançado da doença podem desenvolver fibrose, ulceração, calcificação da bexiga e da uretra, provocando uropatia obstrutiva com hidronefrose. Em alguns países PALOP, o carcinoma da bexiga é uma complicação frequente da schistosomose vesical (Gryseels,

2012; Barroso *et al.*, 2014). De acordo com Lorenzoni *et al.* (2018), a schistosomose urinária é um dos fatores de risco de carcinoma de bexiga em Moçambique.

A fase crónica da schistosomose intestinal começa a partir do 6º mês após a infeção e pode durar vários anos. Os sinais e sintomas comuns desta doença são dor abdominal, desconforto, perda de apetite e diarreia com ou sem sangue (Gryseels, 2012). Os sinais de progressão da doença para diferentes órgãos podem ocorrer, incluindo complicações graves, tais como a hipertensão pulmonar, a hipertensão portal, ascite, hemorragias digestivas e rutura de varizes esofágicas (Junior *et al.*, 2013). Os ovos de *S. mansoni*, *S. japonicum* e *S. intercalatum* causam frequentemente diarreia e hemorragias durante a passagem pelo intestino (Barroso *et al.*, 2014).

1.5. Diagnóstico laboratorial

Existem três tipos de métodos para diagnóstico da schistosomose: métodos parasitológicos ou diretos, métodos imunológicos ou indiretos e métodos moleculares (Feldmeier e Poggensee 1993; Neves *et al.*, 2011).

1.5.1. Métodos parasitológicos ou diretos

Este método baseia-se na pesquisa de ovos de *Schistosoma* na urina (*S. haematobium*), fezes (*S. mansoni* e *S. japonicum*), ou biópsia de tecidos (Colley *et al.*, 2014). A biópsia pode ser realizada em vários órgãos, tais como fígado, bexiga, colo do útero, vagina, períneo para *S. haematobium* (Bustinduy e King, 2014) e biópsia retal para observação dos ovos na mucosa intestinal em *S. mansoni* (Barroso *et al.*, 2014; Reis *et al.*, 1984). A microscopia é utilizada como o principal exame para o diagnóstico da infeção causada por *Schistosoma*, porque permite visualizar o tamanho e a forma típica dos ovos (Figura 4), para além de diferenciar entre as espécies de *Schistosoma* e ovos de outros helmintas (Gryseels, 2012; Colley *et al.*, 2014).

Em inquéritos epidemiológicos, no caso de infeções por *S. haematobium*, é recomendado o método de filtração da urina, pesquisa de hematúria e albuminúria nas

áreas endêmicas, sobretudo na população infantil. Já no caso das espécies em que há eliminação dos ovos pelas fezes, a técnica de referência é de Kato-Katz, que permite determinar a intensidade da infecção através da contagem dos ovos. Estas técnicas são recomendadas pela OMS para mapeamento e controle da schistosomose (Utzinger *et al.*, 2011; Colley *et al.*, 2014; Barroso *et al.*, 2014).

1.5.2 Métodos imunológicos ou indiretos

As técnicas imunológicas baseiam-se na detecção de anticorpos ou antígeno e são bastante sensíveis em relação aos métodos parasitológicos. Estas técnicas não podem ser utilizadas como diagnóstico definitivo, devido à ocorrência de reações cruzadas com outros helmintas, que resultam em falsos-positivos. Os anticorpos podem permanecer em circulação durante muito tempo após a cura da infecção, não servindo para avaliação terapêutica ou para o estabelecimento de critérios de cura. Portanto, estas técnicas não permitem distinguir entre uma infecção passada e recente (Sousa *et al.*, 2007; Utzinger *et al.*, 2009; Colley *et al.*, 2014; Neves *et al.*, 2011). Estes métodos aplicam-se no diagnóstico em viajantes (consulta do viajante) ou migrantes, pois são úteis no diagnóstico de schistosomose aguda quando o exame microscópico ainda é negativo (Gryseels, 2012; Gryseels *et al.*, 2006).

Existem várias técnicas imunológicas descritas para o diagnóstico da schistosomose. Entre elas destacam-se: a técnica de Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (McManus *et al.*, 2018), Teste de Hemaglutinação Indireta (McManus *et al.*, 2018), a Reação de Imunofluorescência Indireta (Neves *et al.*, 2011), Reação Periovular (Neves *et al.*, 2011) e a prova da Tumefacção das cercárias – “Cercarien Hullen Reaktion” (CHR) (Figueiredo, 2014), point-of-care (POC-CCA), que constituem testes altamente específicos no diagnóstico desta parasitose, tanto em estudos clínicos como epidemiológicos. A primeira deteta anticorpos e antígeno, enquanto que a segunda deteta anticorpos e os restantes antígenos, exceto a Reação de Imunofluorescência Indireta.

1.5.3. Métodos moleculares

Atualmente, utiliza-se a técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) para a detecção de ácido desoxirribonucleico (DNA) de *Schistosoma* em pacientes infectados (Gryseels, 2012). Este método pode ser usado principalmente nos casos de controle de cura após quimioterapia e em infecções com baixas cargas parasitárias.

A técnica de PCR foi desenvolvida por Kary Mullis em meados dos anos 80, representando uma verdadeira revolução no mundo científico. Esta técnica permite amplificar de forma seletiva pequenos fragmentos de DNA, de maneira que partindo de uma pequena quantidade de DNA se pode multiplicar o seu número, gerando milhões de cópias, amplificando especificamente somente a região de interesse. Esta técnica baseia-se na utilização de enzimas (polimerases) isoladas de bactérias termofílicas, que são ativas a temperaturas de quase 100 °C, ao contrário da maioria das enzimas (Soriano, 2004).

Os métodos moleculares têm sido considerados eficazes em comparação com as técnicas imunológicas e parasitológicas, devido à sua alta sensibilidade e especificidade. Contudo, o custo e a complexidade da técnica têm sido alguns fatores limitantes para o seu uso generalizado (Neves *et al.*, 2011).

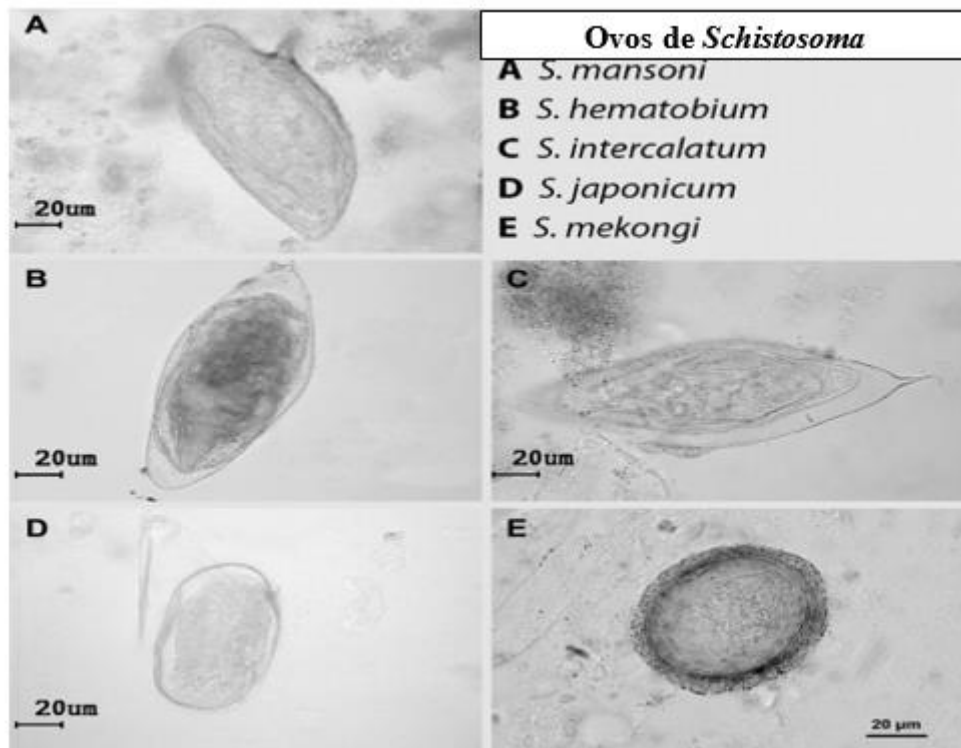


Figura 4. Morfologia dos ovos de diferentes espécies do género *Schistosoma*. (Adaptado de Clerinx e Gompel, 2011)

1.6. Técnicas de biologia molecular utilizadas no estudo dos moluscos

Durante as últimas décadas, a classificação dos moluscos de água doce foi baseada em estudo fenotípicos, isto é, nas características morfológicas da concha, por ser a parte mais resistente e visível do seu corpo e a única geralmente conservada para a classificação, o que se mostrou ser insuficiente para distinguir de entre espécies e subespécies das mesmas (Velez, 2010; Correia, 2011).

Com o avanço de novas abordagens na área de sistemática a partir dos anos 50, descrita por Mayr (1942) e utilizada em planorbídeos por Paraense e Deslandes (1956) citado por Carvalho *et al.* (2008), que preconizavam a adoção simultânea de métodos de outras disciplinas, tais como genética, embriologia, citologia, histologia, fisiologia, ecologia e paleontologia, além da morfologia, nasceu a disciplina da sistemática molecular nos fins do século XX, com a ampliação da genética molecular abordando diversos problemas antes considerados de difícil solução pelas metodologias tradicionais.

Recentemente, o desenvolvimento tecnológico da biologia, levou a avanços significativos e revolucionários. Novas técnicas de clonagem de DNA, análise com enzimas de restrição e sequenciação de DNA, vieram fornecer uma elevada gama de dados relativos aos genomas de uma ampla variedade de organismos. Tais percepções têm um grande impacto em muitas áreas da investigação biológica, e parece ter um grande potencial para estudos da taxonomia e biologia populacional. Estas técnicas trouxeram ao mundo científico novas abordagens para a caracterização e identificação dos moluscos (Rollinson *et al.* 1986), com objetivo de complementar a morfologia e diferenciar espécies presentes em determinadas populações das mesmas (Soriano, 2004).

1.6.1. Marcadores ribossomais

Os espaçadores internos transcritos (ITS) do rDNA, ITS-1 e ITS-2, têm sido amplamente utilizados na identificação de espécies e em estudos taxonómicos envolvendo espécies de diferentes regiões geográficas, através da reconstrução de filogenias (Heloísa *et al.*, 2004; Masco-Coma *et al.*, 2001), e em estudos de variabilidade genética entre espécies muito próximas (Stothard *et al.*, 1996).

Segundo Jorgensen *et al.* (2013), a região ITS-2 tem-se mostrado um excelente marcador no estudo das relações específicas, sub-específicas e populacionais de espécies do género *Bulinus*. Este espaçador situa-se entre os genes 5.8S e 28S e tem uma função na regulação da transcrição de subunidades ribossómicas ativas, já que este espaçador fornece elementos estruturais necessários para o correto processamento do pré-rRNA ribossomal.

1.6.2. Marcadores mitocondriais

O DNA mitocondrial é um genoma extranuclear, que foi descoberto em 1960, e contém genes essenciais ao processo celular de fosforilação oxidativa. O DNA mitocondrial está presente em quase todos os eucariotas e é herdado por via exclusivamente materna, possibilitando, assim, que esta molécula seja usada como um importante marcador molecular com objetivo de traçar a história evolutiva de uma determinada espécie, bem como a filogenia entre as populações existentes. Também

apresenta uma taxa de mutação quatro vezes maior que o DNA nuclear e, por essa razão, tornou-se popular em estudos evolucionários e filogenéticos (Rosa e Paiva, 2009; Correia, 2011). A subunidade I da citocromo oxidase (COI) do DNA mitocondrial tem sido explorada para a identificação de espécies, discriminar subespécies e estudar a evolução de moluscos, incluindo *Bulinus* (Stothard *et al.*, 1996; Jones *et al.*, 2001; Stothard *et al.*, 2002; Akinwale *et al.*, 2011).

1.7 Tratamento

O praziquantel é o principal fármaco para o tratamento e controlo da schistosomose, devido à sua alta eficácia para todas as espécies do género *Schistosoma*, reduzida toxicidade e fácil administração. Administra-se por via oral, numa dose única de 40 mg/kg de peso corporal (Gryseels, 2012). De acordo com diferentes autores, a taxa de cura varia de 70 a 100%. Contudo, este fármaco tem pouco ou nenhum efeito sobre ovos e parasitas imaturos. Os efeitos secundários decorrentes do uso do fármaco incluem dor abdominal, náuseas, diarreia (às vezes com sangue), sonolência, tonturas, mal-estar, urticária e vômitos (Gryseels *et al.*, 2006; Rey, 1987; Barroso *et al.*, 2014).

Segundo Gryseels *et al.* (2006) e Colley *et al.* (2014), os derivados de artemisinina são eficazes para matar as formas imaturas de *S. japonicum*, *S. mansoni* e *S. haematobium*. No entanto, não é recomendável em áreas endémicas de malária, pois pode promover a resistência à artemisina em *Plasmodium* (Gryseels *et al.*, 2006). De acordo com Barroso *et al.* (2014) e Rey (1987) o metrifonato e o nitridazol têm efeito contra *S. haematobium*. A dosagem recomendada para metrifonato é de 7.5 mg/Kg de peso por via oral enquanto que para nitridazol é de 20 a 25 mg/Kg de peso.

A oxamniquina é eficaz contra *S. mansoni* mas não contra *S. haematobium* ou *S. japonicum* (Gryseels *et al.*, 2006; Rey, 2010). Administra-se oralmente, em dose única de 15 mg/kg nos adultos. Em crianças com menos de 30 kg, recomendam-se 20 mg/kg de peso, dividida em duas doses de 10mg/kg, tomadas com intervalo de 4 a 6 horas (Rey, 2010; WHO, 2002; Rey, 1987). Segundo Rey, (2010) o tratamento com oxamniquina pode seleccionar linhagens de *S. mansoni* resistentes a esse fármaco. Assim, em pacientes que, tendo recebido a medicação correta, não se curaram, é conveniente refazer o tratamento

com outro fármaco (e.g. praziquantel). A oxamniquina é contra-indicada em pessoas com antecedentes neurológicos, pois, em raros casos, pode provocar excitação mental, alucinações ou convulsões, que regredem em menos de seis horas (Rey, 2010; Rey, 1987). Os efeitos colaterais são: tonturas, sonolência e cefaleia, razão pela qual se recomenda tomar de preferência à noite, depois da refeição. Em alguns casos há náuseas, vômitos ou diarreia (Rey, 2010).

1.8. Prevenção e controlo

A transmissão da schistosomose depende sempre de três fatores: hospedeiro definitivo, hospedeiro intermediário e o contacto do hospedeiro definitivo com as coleções de água contaminada. Assim, o controlo desta parasitose passa por evitar o contacto com águas potencialmente contaminadas com cercárias (rios, lagos e valas de drenagem), recorrendo à utilização de luvas e calçado adequado; implementação de saneamento básico para evitar que haja contacto dos ovos (presentes nas fezes e/ou urina) com a água; controlo dos moluscos; educação sanitária; e tratamento em massa ou especificamente de indivíduos infetados (Barroso *et al.*, 2014; Rey, 1987; Bustinduy e King, 2014).

1.9. Schistosomose em Moçambique

Moçambique é um país com altas taxas de prevalência de schistosomose, variando a endemicidade de região para região. Estima-se que cerca de 13 milhões de pessoas estão infetadas (Adenowo *et al.*, 2015), sendo as regiões norte e centro onde se observa maior taxa de prevalência desta parasitose.

Segundo relatórios do serviço de saúde Moçambique os primeiros casos de schistosomose vesical foram diagnosticados em 1904 (Gujra e Vaz, 2000). Em 1952, na zona sul do país foi realizado um estudo em indivíduos com idades compreendidas entre os 3 e os 34 anos, em que foi observada uma taxa de prevalência de infeção por *S. haematobium* de 61.5% (Azevedo *et al.*, 1954). Segundo Rey *et al.* (1987), num estudo efetuado numa aldeia comunal na província de Maputo, a prevalência em adultos e

crianças foi de 19.4%. Posteriormente em 1991, foi realizado um estudo em prisioneiros de três prisões e de uma prisão da cidade e arredores de Maputo, onde se observou uma prevalência de 17.4% de schistosomose vesical (Vaz, 1992). Em 1994 e 1995 foram realizados estudos no distrito de Boane (província de Maputo) e no vale do Infulene e Mahotas (cidade de Maputo), observando-se prevalências de 42.4% e 8.6% respectivamente (Traquinho *et al.*, 1994; Enosse *et al.*, 1995). No ano seguinte em 1996, num estudo em três escolas das Mahotas, IV congresso e Av. das FPLM da cidade de Maputo, observou-se uma prevalência de infecção de 11.3% (Gujra e Vaz, 2000). Em 2009, foi realizado um estudo em todas as províncias e distritos de Moçambique, onde se verificou uma prevalência de 47% para *S. haematobium* e 1% para *S. mansoni*, num total de 83.331 participantes. Ainda neste estudo, verificou-se que as províncias da zona norte (Cabo Delgado, Niassa e Nampula) e centro (Zambézia) apresentavam as taxas mais elevadas de prevalência de schistosomose (Gerito *et al.*, 2009).

Em 2016, foi efetuado um estudo no distrito de Gurué e Quelimane onde se registou uma prevalência de 73.4% para schistosomose urinária (Alfredo, 2016). Recentemente, em 2018, foi publicado um trabalho desenvolvido na província de Cabo Delgado no norte de Moçambique, em 10 distritos, onde se registou uma prevalência de 60.4% para schistosomose causada por *S. haematobium* (Phillips *et al.*, 2018).

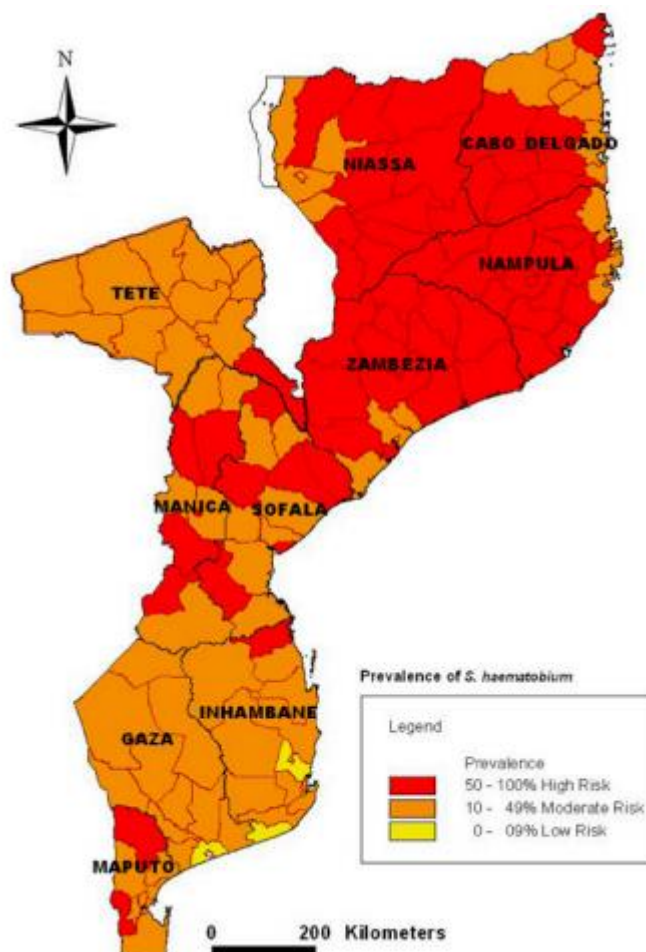


Figura 5. Distribuição da schistosomose urinária em Moçambique. Fonte: (Gerito *et al.*, 2009)

1.9.1. Caracterização geográfica de Moçambique

O território Moçambicano é constituído por 11 províncias nomeadamente: Niassa, Cabo Delgado e Nampula (zona norte), Zambézia, Tete, Manica e Sofala (zona centro), Inhambane, Gaza, Maputo Província e Maputo cidade (zona sul). Estas províncias encontram-se divididas em 151 distritos, que por sua vez se dividem em 405 postos administrativos, e estes em localidades, 53 autarquias locais, denominados municípios. A província de Niassa é a que tem a maior superfície, 129.056 km², representando cerca de 16.3% da superfície do país. A Zambézia é a segunda província com maior superfície de 105.008 km² com cerca de 13.1% (Gaspar *et al.*, 2011; Muchangos, 1999). De acordo com dados preliminares dos censos de 2017, Moçambique tem aproximadamente 29 milhões de habitantes (<http://www.ine.gov.mz/iv-censo-2017>).

Quanto à rede hidrográfica, existem cerca de 25 bacias de norte para sul. As principais bacias hidrográficas que drenam o país são: Rovuma, Messalo, Montepuez, Lúrio, Monapo, Ligonha, Licungo, Zambeze, Púnguè, Búzi, Save, Govuro, Inharrime, Limpopo, Incomáti, Umbelúzi, Tembe e Maputo. A maior parte dos rios moçambicanos têm suas nascentes nos países vizinhos, exceto no norte do país, onde a maior parte tem a sua bacia hidrográfica totalmente em Moçambique. Isto deve-se ao carácter morfológico da África Oriental e à localização geográfica do país nas regiões costeiras.

Relativamente ao clima, existem duas estações: estação quente e chuvosa, que vai de Outubro a Março, e estação seca e fresca, de Abril a Setembro (Muchangos, 1999).

Capítulo 2 - Objetivos

2.1. Objetivos

A schistosomose urinária é considerada uma Doença Tropical Negligenciada causada por parasitas trematódes do género *S. haematobium* e que têm grande impacto a nível da saúde pública, a nível socioeconómico e da qualidade de vida das populações. Em Moçambique esta parasitose é considerada endémica em todo país.

Neste contexto, o presente estudo tem como objetivo geral determinar a taxa de infeção não patente com *S. haematobium* em populações de *Bulinus* sp e caracterizar e comparar as populações de caracóis e *S. haematobium* na Zambézia – Moçambique.

Os objetivos específicos são:

- Identificar a espécie de *Bulinus* sp em dois corpos de água de Gurué.
- Estimar o grau de isolamento genético entre duas populações de *Bulinus* sp em Gurué, através da estimativa da diversidade genética dentro e entre essas populações, a nível nuclear e mitocondrial.
- Relacionar geneticamente as populações de *Bulinus* sp de Gurué com outras populações africanas.
- Estimar a taxa de infeção pré-patente destes caracóis, nas duas populações, por *S. haematobium*.
- Estimar a taxa de infeção individual de grupos de caracóis que libertaram cercárias.
- Estimar o estadio de infeção pré-patente nos caracóis através da comparação entre duas regiões do corpo (região cefalopodal e hepatopâncreas).
- Estimar a diversidade genética de *S. haematobium* de Gurué.
- Relacionar geneticamente *S. haematobium* de Gurué com outras populações africanas.

Capítulo 3 - Materiais e métodos

3.1. Descrição da área do estudo

O presente estudo analisou amostras de caracóis do género *Bulinus* sp, colhidos no distrito de Gurué na província de Zambézia em Moçambique. O distrito de Gurué localiza-se a norte da Província de Zambézia, na região da Alta Zambézia, fazendo limite com os distritos de Milange, Namarroí, Errego e Alto Mólocuè na mesma província; e limitando-se ao norte pelos distritos de Malema, na província de Nampula e de Mecanhelas na província de Niassa (Direção Nacional da Administração Local, 2005).

O clima do distrito de Gurué é considerado do tipo húmido, mesotérmico moderado com deficiência de água no inverno. O distrito apresenta uma precipitação média anual cerca de 1,995.7 mm. O período chuvoso inicia-se nos finais do mês de outubro, entendendo-se até julho/ agosto do ano seguinte. A temperatura média anual é de 21.9 °C sendo a mais alta no mês de novembro (32.5 °C) e a mais baixa no mês de julho (12.3 °C).

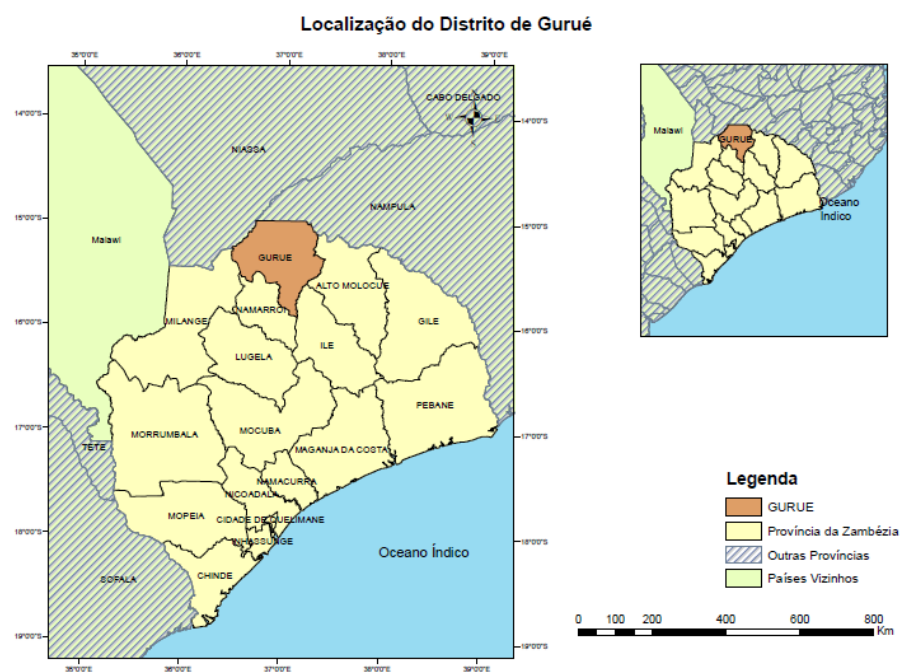


Figura 6. Mapa da Província da Zambézia mostrando a área do estudo, e indicando a proveniência das amostras. Autoria: Yarin Abdula, com o programa ArcGis.

3.2. Amostra

Utilizou-se uma amostra com um total de 105 caracóis do género *Bulinus*, obtidas em junho de 2016 no distrito de Gurué e foram cedidas gentilmente pelo estudante Célio Alfredo no âmbito da dissertação de Mestrado efetuada no Instituto de Higiene e Medicina Tropical – Universidade Nova de Lisboa, intitulada “Controlo pós-terapêutico da schistosomose e das parasitoses intestinais e atualização da situação malacológica nos distritos de Quelimane e Gurué, na província da Zambézia – Moçambique”. Estas amostras tinham sido depositadas na coleção do Departamento de Helminologia Médica e Malacologia Médica do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, fixadas a álcool 70%. Cinco caracóis pertenciam a um grupo que tinha libertado cercárias e os restantes não tinham eliminado cercárias. Cada indivíduo foi dividido em região cefalopodal e hepatopâncreas (Anexo 1).

3.3. Análises moleculares

3.3.1. Extração do DNA genómico de *Bulinus* sp

O DNA genómico foi extraído de cada caracol com base no método modificado de Stothard *et al.* (1996). Cada caracol foi removido do etanol a 70% e embebido em tampão TE, durante a noite, de modo a retirar o etanol restante. O tecido de cada um dos caracóis foi colocado num tubo esterilizado de 1.5 ml, adicionou-se 600 µl de solução tampão CTAB (Cetyltrimethylammonium Bromide, Amnesco ®- C9H42NBr) aquecido na estufa a 60 °C. O tecido foi macerado, seguido da adição de 10 µl de proteinase K e homogeneizado até que os tecidos ficassem completamente dissolvidos na solução tampão e incubada durante 1h. Após o período de incubação foi adicionado 0.75 ml de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e agitado por inversão durante 2 minutos, seguidamente centrifugado durante 10 segundos a 16,000 g. Retirou-se o sobrenadante, colocou-se noutra microcubo estéril, ao que foi adicionado 1 mL de etanol absoluto a 4 °C, e centrifugou-se durante 15 minutos a 16,000 g. Retirado o sobrenadante, lavou-se o pellet obtido com 500 µl de etanol a 70% e centrifugado novamente durante 15 minutos a 16,000 g. Após esta última centrifugação, retirou-se novamente o sobrenadante, e

colocou-se a 37 °C durante 10 minutos, para evaporação total do etanol. Em seguida, adicionou-se 50 µl de tampão TE e agitou-se para o pellet dissolver. Verificou-se a qualidade e quantidade de DNA através de electroforese em gel de agarose a 1.5% (m/v) em tampão TAE (Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1 mM; pH 8.3), com posterior coloração com brometo de etídio na concentração final de 0.5 µg/ml, e, em paralelo, em espectrofotómetro (NanoDrop ND-1000) para medição mais exata da concentração (ng/µl) e qualidade (razão das absorbâncias A260/A280). As amostras foram armazenadas a -20 °C, até à sua utilização.

3.3.2. Caracterização molecular de *Bulinus* sp

Um marcador nuclear (ITS) e um marcador mitocondrial (COI), bem representados para o género *Bulinus* em bases de dados, foram escolhidos para identificar a espécie e avaliar a diversidade genética dos moluscos.

3.3.2.1. Amplificação da Região Interna Transcrita (ITS) do DNA ribossomal

Para amplificação por PCR da região ribossómica ITS (Figura 7) utilizaram-se os *primers* Etts1 5'TGC TTA AGT TCA GCG GGT 3' e Etts2 5' TAACAAGGTTTCCGTAGGTGAA 3' (Kane e Rollinson, 1994). A reação de PCR foi efetuada num volume de 10 µl, contendo: 5 µl de Master Mix (2x, NZytech), 0.5 µl de cada primer (10 pmol/µl), 1 µl de DNA (50 ng/µl) e 1 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) a 5%. Foi feita uma desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos a 95 °C por 15 segundos, 58 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto e 30 segundos. A extensão final foi efetuada a 72 °C por 10 minutos.

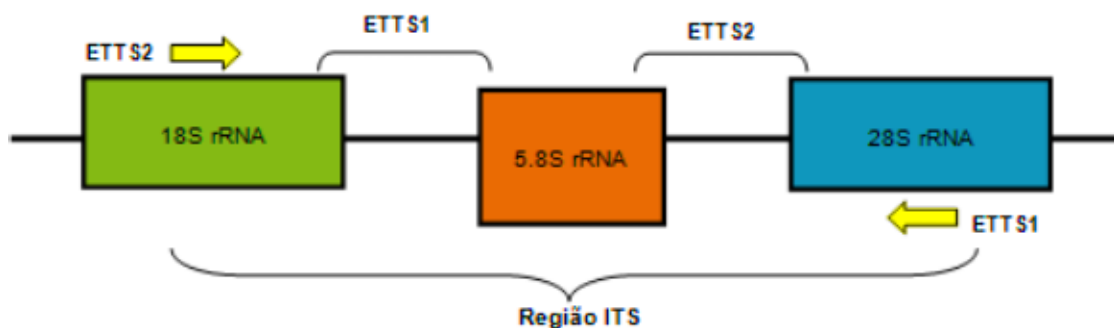


Figura 7. Representação esquemática da região ITS. Adaptado de Kane e Rollinson, 1994

3.3.2.2. Amplificação do gene para citocromo oxidase c (COI)

Para amplificar o gene para a citocromo oxidase c usaram-se primers específicos para *B. globosus*, Bg-COI fwd 5'TAGAAATTAGGAACTTCTGTTC3' e Bg-COI Rvs 5'GCAATAAATTATAGCAGC3', com um fragmento esperado de 820 pb. As amostras foram amplificadas num volume de 10 µl, consistindo em 5µl de master mix (2X, NZytech), 0.5µl de cada primer (10 pmol/ µl) e 1µl de DNA (50 ng/ µl). O perfil térmico utilizado foi: desnaturação a 94 °C durante 5 minutos, seguido de 45 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 60 °C por 30 segundos, seguindo da extensão final a 72 °C durante 10 minutos.

3.3.3. Detecção e caracterização molecular de infecção por *S. haematobium* em *Bulinus*.

3.3.3.1. Amplificação de região repetitiva Dra1

A detecção inicial do parasita *S. haematobium* no molusco foi efetuada por amplificação por PCR de uma região repetitiva, usando primers Dra1 Fwd 5'GATCTCACCTATCAGACGAAAC3' e Dra2 Rvs 5'TCACAACGATACGACCAAC3' (Hamburger *et al.*, 2001). A amplificação foi efetuada num volume total de 20 µl, numa solução contendo 2 µl de PCR buffer 10x (Canvax), 2 µl de MgCl₂ (25 mM), 2 µl de dNTPs (8 mM, Canvax), 1 µl de cada primer (10 pmol/µl) e 0.2 µl de Horse-Power-Taq DNA polymerase (5U/µl, Canvax) e 2 µl de

DNA (50 ng/ µl). O perfil térmico foi como descrito por Hamburger *et al.* (2001) e otimizado para os reagentes e termociclador utilizado e as amostras estudadas. Foi feito 1 ciclo de desnaturação a 94 °C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos a 95 °C por 1 minuto, 55 °C por 1 minuto e 72 °C por 30 segundos, com uma extensão final a 72 °C por 10 minutos.

3.3.3.2. PCR Multiplex de COI

Para identificar a espécie do parasita, amplificou-se por PCR multiplex a região COI em todas as amostras positivas para PCR de Dra1. Neste PCR multiplex usou-se um primer forward universal e dois primers reversos que geram fragmentos de tamanhos diferentes e específicos para *S. haematobium* e *S. bovis* (Webster *et al.*, 2010), tendo sido desenhado e utilizado neste trabalho um novo primer para amplificação de um fragmento específico para *S. matthei* (Tabela 2). O novo primer foi escolhido a partir de um alinhamento das sequências de *Schistosoma* spp. disponíveis para este gene. As reações ocorreram num volume de 10 µl, consistindo em 5µl de master mix (2X, NZytech), 0.5µl de cada primer (10 pmol/µl) e 1µl de DNA (50 ng/ µl). O perfil de amplificação foi: 95 °C por 5 min, seguido de 40 ciclos a 95 °C durante 30 s, 61 °C durante 30 s e 72 °C durante 1 min, com uma extensão final a 72 °C durante 10 min. Como controlo positivo utilizou-se DNA de *S. haematobium*. Não havendo no laboratório DNA das outras duas espécies (*S. bovis* e *S. matthei*), amplificou-se a região correspondente de uma amostra de *S. haematobium* com um primer composto pela sequência do primer da espécie desejada, com a sequência da região 3' para *S. haematobium* e uma âncora GC na região 5': Sb.Rc e Smt.Rc. Os fragmentos gerados foram usados como DNA padrão para amplificação de controlos positivos para cada espécie.

Tabela 2. Primers utilizados para amplificação de Multiplex PCR de COI e de controles positivos.

Nome	Sequência 5' – 3'	Tamanho do fragmento
Shb.F	TTTTTTGGTCATCCTGAGGTGTAT	
Sh.R	TGATAATCAATGACCCTGCAATAA	543 pb
Sb.R	CACAGGATCAGACAAACGAGTACC	306 pb
Sm.R*	AACAAACCAAGTGTCATGAAAC	400 pb
Sb.Rc*	cccgggCACAGGATCAGACAAACGAGTACCacatctttta agcatatataatc	306 pb
Smt.Rc*	cccgggAACAAACCAAGTGTCATGAAACaatatatctaag aagaagc	400 pb

* Novo primer desenvolvido no âmbito deste trabalho.

3.3.3.3. Desenvolvimento e aplicação de nested-PCR Multiplex de COI

Para aumentar a sensibilidade do PCR multiplex amplificou-se uma região maior de COI numa primeira reação de nested-PCR multiplex. Foram desenhados quatro primers (Tabela 3), localizados em regiões conservadas em *Bulinus* sp. e identificadas num alinhamento de todas as sequências disponíveis, para escolher a melhor combinação em PCR.

Na primeira reação, os primers nsh.F2 e nsh.R2, nsh.F2 e snh.R1 foram utilizados como primers externos, enquanto que, na segunda reação (PCR multiplex, ver 3.3.3.2), utilizou-se 1 µl do produto amplificado da primeira reação e diluído 1:10. Os reagentes e o perfil térmico da primeira reação foi efetuado como está descrito em 3.3.2.2.

Tabela 3. Primers utilizados para amplificação de Nested PCR de Multiplex de COI

Nome	Sequência 5' – 3'	Tamanho do fragmento
nSh.F2	gagttgAGTTTATACTATGGTTGTGG	1000 pb
nSh.R2	ctccttaACACTTTAATTCAATAATATTC	
nSh.F1	CCTATGGGTGGkGGTGATCC	950 pb
nSh.R1	ggcaaACCATGAATACCTAAATAATGC	

3.4. Electroforese

Após amplificação, todos os produtos de PCR foram submetidos a electroforese num gel de agarose a 1.5% (m/v). A migração ocorreu a 120 V por pelo menos 30 minutos. De seguida, o gel foi corado com Brometo de etídio durante 5 minutos, visualizado no transluminador ultravioleta (Alpha Innotech) e fotografado.

3.5. Sequenciação de DNA

Alguns produtos de PCR (COI e ITS) de parasita e molusco foram sequenciados utilizando os mesmos primers que tinham sido utilizados para PCR na empresa STAB VIDA - Inv. e Serv. Ciências Biológicas, Lda, Portugal (www.stabvida.com).

3.6. Análise de sequência e filogenia

As sequências nucleotídicas obtidas foram verificadas e editadas no programa Chromas 2.6.5 (Technelysium), e, se necessário, sequências consenso foram obtidas no programa BioEdit versão 7.2 (Hall A. Thomas, 1999). Sequências homólogas da mesma espécie, ou espécies relacionadas e depositadas na base de dados *NCBI* (National Center for Biotechnology Information) “Genbank, foram obtidas utilizando a ferramenta online “*Basic Local Alignment Search Tool*” (BLAST), disponível em *NCBI* (National Centre for Biotechnology; www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). As sequências foram alinhadas usando o algoritmo ClustalW no programa BioEdit versão 7.2 (Hall A. Thomas, 1999).

A análise filogenética foi realizada no programa MEGA X (Kumar *et al.*, 2018). Inicialmente, selecionou-se o modelo de mutação mais apropriado, que foi usado para produzir árvores por Neighbor-Joining (Saitou e Nei, 1987) e por máxima verossimilhança. Redes filogenéticas foram geradas, para alinhamentos de sequências com bases ambíguas ou heterozigóticas, no programa SplitsTree4 versão 4.14.6, utilizando o algoritmo NeighborNet e as distâncias calculadas através do modelo Kimura-2-parameter.

3.7. Análise estatística

Foi utilizado o programa estatístico EpiTools para calcular prevalência de infecção nas duas regiões do corpo do caracol, cefalopodal e hepatopâncreas. Os dados foram analisados com o teste de Wilson, com um valor de intervalo de confiança de 95 %. O valor de especificidade foi de 99 %.

Capítulo 4 - Resultados

4. Resultados

4.1. Extração de DNA

De um total de 105 caracóis, divididos em regiões cefalopodal e hepatopâncreas, obteve-se DNA, confirmado por eletroforese em gel de agarose e quantificado por espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000). As concentrações de DNA obtidas variaram entre as duas populações, sendo que da região cefalopodal se obtiveram valores máximos, mínimos e médias mais altos em relação à região hepatopâncreas (Tabela 4).

Tabela 4. Valores de concentração de DNA

Local da Colheita	Região do caracol	Número da amostra	Valor Mínimo [DNA] ng/ul	Valor Máximo [DNA] ng/ul	Média [DNA] ng/ul
Rio	Cefalopodal	50	40.7	813.6	243.64
Mutxora	Hepatopâncreas	50	11.3	695.2	213
Lagoa - Barragem	Cefalopodal	55	57.8	1785.7	768.54
	Hepatopâncreas	55	39.3	1172.1	385.53

4.2. Caracterização molecular de *Bulinus* sp

4.2.1. Amplificação de ITS

Ao todo, foram analisadas 210 amostras de DNA de 105 caracóis do género *Bulinus*, divididos em região cefalopodal e hepatopâncreas, para confirmação da qualidade do DNA obtido. Obteve-se produtos de amplificação para a região ITS a partir de todas as amostras, tendo-se obtido, num total de 210 amostras, amplificação do fragmento esperado de 1200 pb (Figura 8) em apenas 202. Sessenta amostras apresentaram duas bandas (Figura 8), sendo 24 da região cefalopodal e 36 de hepatopâncreas. Foram utilizados três tipos de controlos, nomeadamente, DNA do caracol não parasitado, DNA do parasita não parasitado (colónia laboratorial) e mistura de DNA de parasita em DNA de caracol para otimização da técnica.

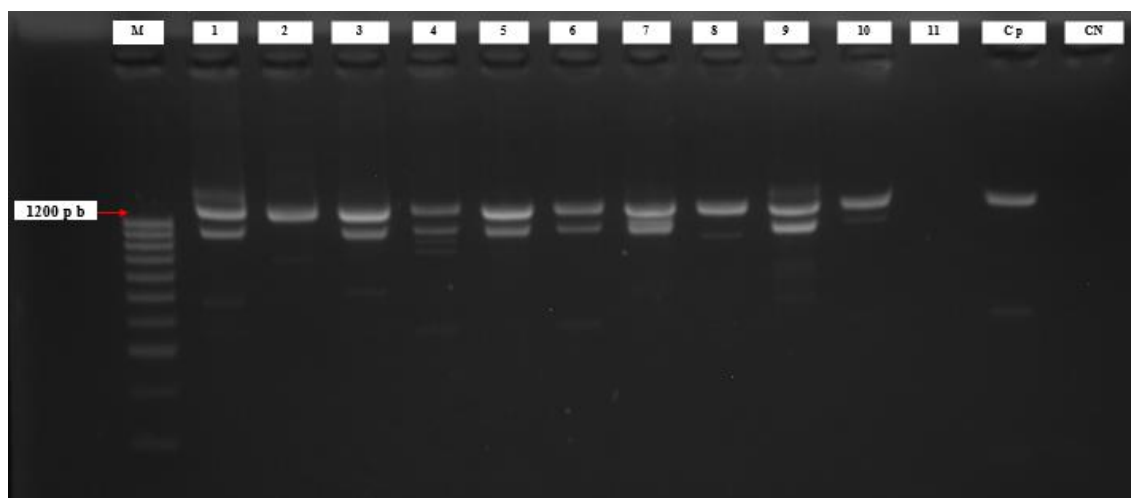


Figura 8. Produto da amplificação da região ITS do rDNA em gel de agarose a 1.5%.
M- Marcador molecular; 1-11: amostras A201 - A210; Cp –controle positivo (DNA caracol); CN – controle negativo

4.2.2. Amplificação do gene COI da região DNA mitocondrial

A amplificação de COI por PCR produziu um único fragmento com o tamanho esperado de aproximadamente 820 pares de bases em todas as 210 amostras (Figura 9 e Quadro 1 Anexo). Utilizou-se DNA do parasita, DNA do caracol não parasitado (colônia laboratorial) e mistura de DNA do parasita em DNA de caracol como controles na otimização da técnica.

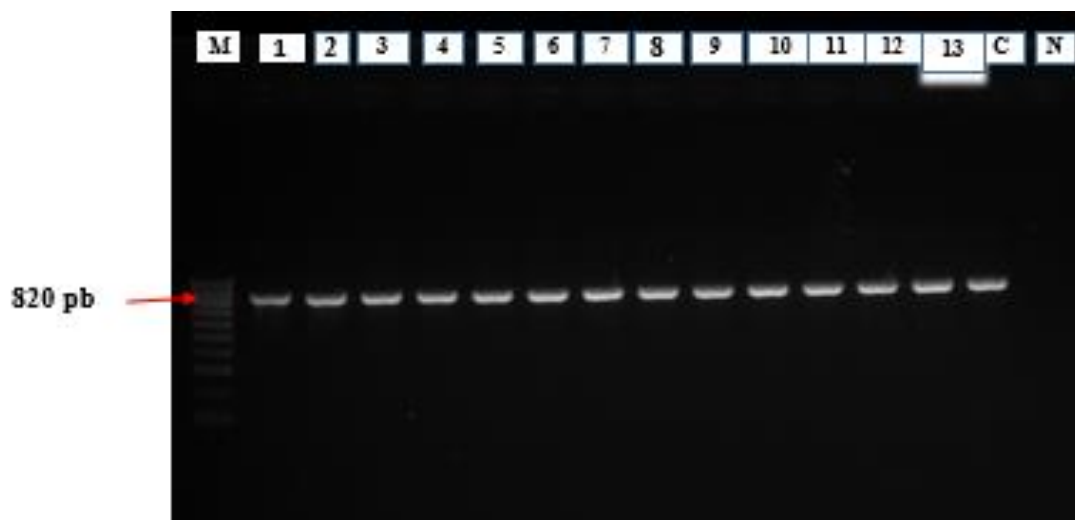


Figura 9. Amplificação de produto de PCR em gel de agarose a 1.5% do gene COI. M- Marcador; 1 - 13 – amostras A198 – A210 C – controle positivo (DNA do parasita); N – controle negativo

4.2.3. Análise filogenética de *Bulinus* sp

Sequenciou-se, para confirmação do produto amplificado e identificação e caracterização das duas populações de caracóis, os produtos de ITS de quatro amostras (A1 e A3 do rio Mutxora e A101 e A102 da Lagoa-Barragem) da região cefalopodal e de COI de 19 amostras, dos quais 14 amostras eram da região cefalopodal (Mutxora-Gurue: A1, A2, A3, A4, A5, A10 e A11; Lagoa-Barragem: A102, A104, A111, A122, A124, A201 e A203) e cinco da região hepatopâncreas (A120, A170, A180, A196, A202, todas de Lagoa-Barragem). Em pesquisa por BLAST, as sequências mais próximas, para os dois marcadores, foram do gênero *Bulinus*. Para o marcador ITS a sequência mais próxima foi a que tinha como código de acesso AM921985.1, com valor de identificação a 100% e valor de cobertura de consulta de 100%. Para o marcador COI as sequências mais semelhantes tinham os códigos de acessos AM921823.1 e AM921820.1, com valor de identificação de 99% e de cobertura de consulta foi de 99%. Todas as sequências homólogas do gênero *Bulinus* disponíveis na base de dados GenBank obtidas por BLAST foram comparadas e alinhadas com as obtidas neste trabalho no programa Bioedit. A história evolutiva foi inferida usando o algoritmo de Neighbor-Joining, tendo como base as distâncias genéticas calculadas pelo modelo de Tamura-Nei, considerado como o mais apropriado, no programa MEGAX.

As sequências de ITS das amostras A1 e A3, do rio Mutxora, eram indistinguíveis entre si, mas distintas das amostras A101 e A103, da Barragem, também indistinguíveis entre si. As sequências das amostras do rio Mutxora e da Barragem agruparam, respetivamente, com sequências das espécies *B. globosus* e *B. africanus* (Figura 10), mas com apoio de bootstrap bastante inferior a 85 %. A árvore produzida apresentou no geral valores baixos de bootstrap e as sequências de *B. globosus* não agruparam num grupo monofilético. As sequências de *B. africanus* agruparam com sequências da amostra em estudo de Moçambique e *B. globosus* da Tanzânia, Uganda e Quênia (Figura 10). As sequências de ITS obtidas foram submetidas à base de dados Genbank, tendo os seguintes números de acessos: MK275663, MK275664, MK275665 e MK275666, respetivamente para as amostras A1, A2, A3, A4, A5, A10, A11, A102, A104, A111, A120, A122, A124, A170, A180, A196, A201, A202, A203.



Figura 10. Árvore filogenética produzida a partir de sequências de ITS do género *Bulinus*. Usou-se o algoritmo de Neighbor Joining com as distâncias calculadas usando o modelo Tamura-Nei no programa MEGA X. Bootstrap com 1000 réplicas, sendo considerados significativos apenas os valores acima de 85 %.

As sequências de COI obtidas de moluscos do rio Mutxora eram indistinguíveis, assim como as dos moluscos da Barragem, mas diferiam entre os dois locais de origem. Na análise filogenética, estas sequências agruparam uma com a outra com valores altos de bootstrap, e com sequências da espécie *B. globosus*, com um valor de apoio de bootstrap

de 97% (Figura 11). Mais especificamente, as amostras estudadas agruparam com amostras da Tanzânia, ilha de Pemba, suportado por um valor de bootstrap de 99%, e num grupo maior que também inclui amostras da África do Sul, suportado por um valor de bootstrap de 99%. Nesta árvore, *B. africanus* agrupa num clado separado das outras espécies de *Bulinus* nomeadamente *Bulinus sp*, *Bulinus nasutus* e *B. globosus*. As sequências de COI foram submetidas à base de dados Genbank, tendo os seguintes números de acessos: MK293602-20, respetivamente para as amostras.

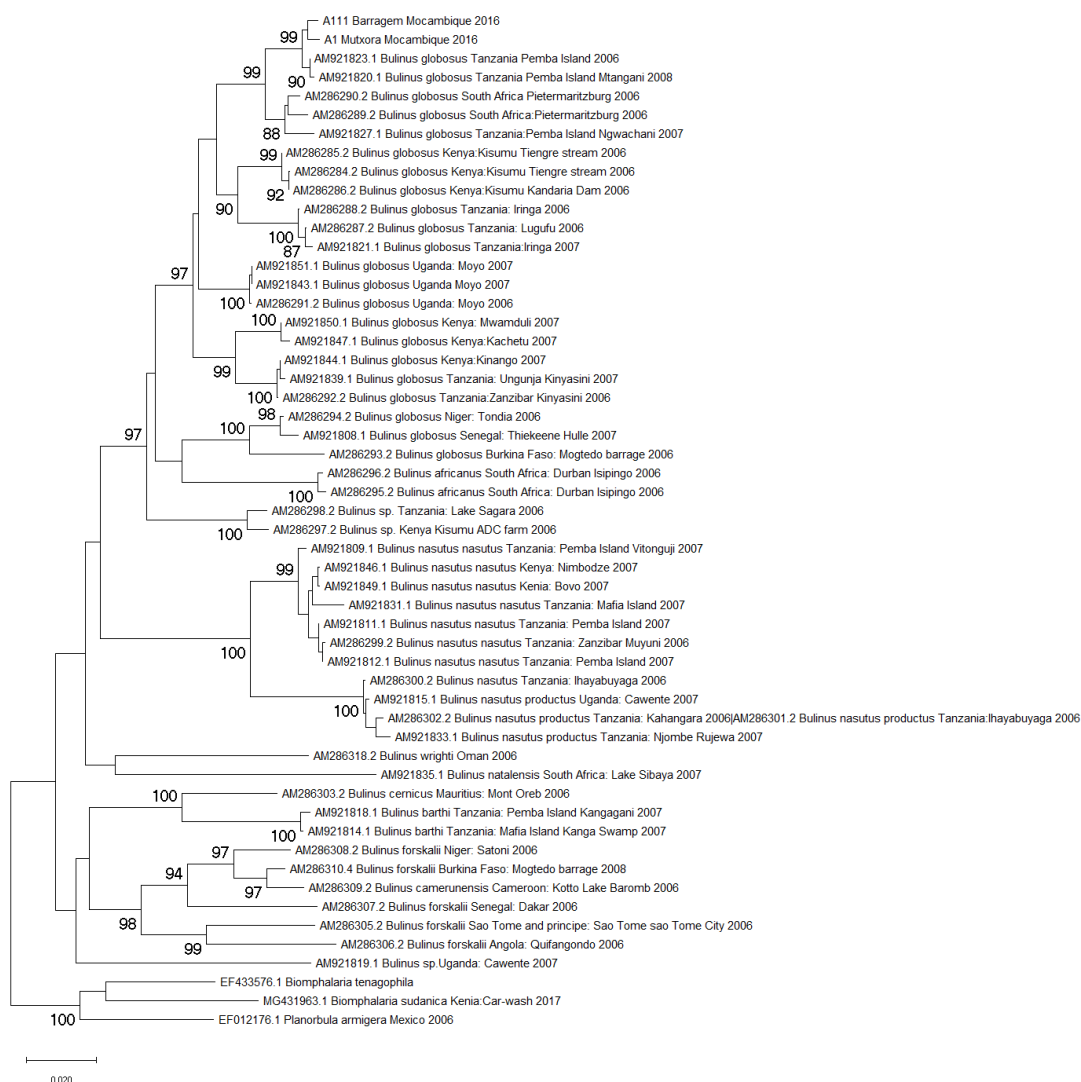


Figura 11. Árvore filogenética produzida a partir de sequências de COI para o género *Bulinus*. Usou-se o algoritmo de Neighbor Joining com as distâncias calculadas usando o

modelo Tamura-Nei no programa MEGA X. Bootstrap com 1000 réplicas, e mostrando apenas os valores acima de 85 %. *Biomphalaria sudanica*, *Biomphalaria tenagophila* e *Planorbula armigela* foram usadas grupo externo para estimar a raiz do género *Bulinus*.

4.3. Detecção e caracterização molecular de infecção por *S. haematobium* em *Bulinus*.

4.3.1. Amplificação de região repetitiva Dra1

A sensibilidade da amplificação da região repetitiva Dra1 de *S. haematobium* foi de 89% no total (18/ número testadas), calculada através de três réplicas de PCR, sendo que num total de 18 amostras, 15 amostras foram positivas nas três réplicas e três apenas numa. A sensibilidade por região foi de 85% e 100%, respetivamente, para amostras da região cefalopodal e hepatopâncreas.

Obteve-se amplificação do fragmento esperado de aproximadamente 121 pb em 18 amostras, todas apenas de Lagoa-Barragem (Figura 12). Destas, 14 eram da região cefalopodal e quatro de hepatopâncreas, o que corresponde a uma taxa de infecção de 7.7 % e 1.96 %, respetivamente. Nos diferentes grupos de cinco caracóis não se detetou amplificação na região cefalopodal e hepatopâncreas simultaneamente no mesmo molusco, havendo, portanto, deteção de parasita ou numa região ou noutra. Dos cinco moluscos que tinham libertado cercárias, em apenas dois se obteve amplificação de DNA parasitário (40 %).

Assim, a prevalência de infecção registada em Mutxora foi de 0%, e Lagoa-Barragem por região do corpo do caracol foi de 28 % (IC 95 % 17 a 41 %) e 8 % (IC 95% 3 a 18 %), respetivamente, para amostras da região cefalopodal e hepatopâncreas. O total de prevalência de infecção em Lagoa-Barragem será, então, de 36%. Utilizou-se os valores de sensibilidade do método, acima mencionado, para este cálculo de prevalência.

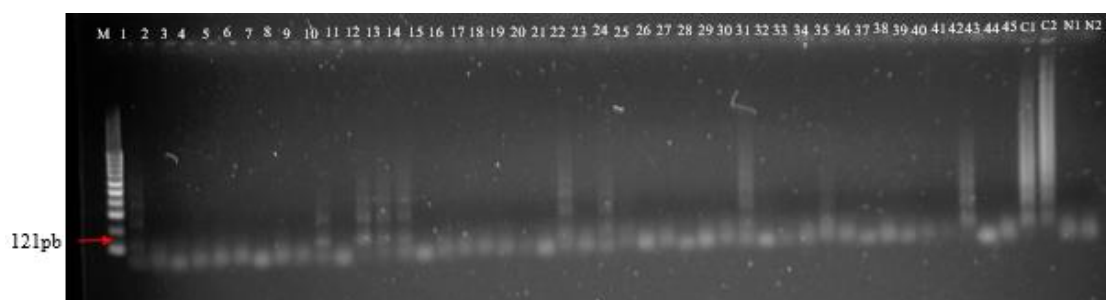


Figura 12. Produto de amplificação de PCR em gel de agarose a 1.5% do gene Dra1. Marcador - M; 1-45: Amostras A111 -A154; Controlos positivos - C1 (DNA do parasita) e C2 (mistura do DNA do parasita e DNA do caracol); Controlos negativos; N1 - (DNA caracol) e N2 - (água).

4.3.2. PCR Multiplex de COI

Os controlos artificiais criados para *S. matthei* e para *S. bovis*, amplificaram bandas específicas e tendo-se obtidos tamanho de fragmentos esperado 450 pb e 300 pb, respetivamente (figura 13). O mesmo utilizou –se na identificação das amostras em estudo para PCR multiplex e nested PCR multiplex.

Foram analisadas 28 amostras de DNA de moluscos, das quais, 18 tinham sido positivas em PCR de Dra1 e 10 amostras correspondem a cinco moluscos de um grupo que tinha libertado cercárias. Obteve-se produto de amplificação em 17 amostras (Figura 13). O tamanho dos fragmentos obtidos era indistinguível da amostra controlo de *S. haematobium*. Uma das amostras (A132) apresentou um produto de amplificação (5, na Figura 13) semelhante ao fragmento controlo para *S. matthei*. Contudo, após repetição da amplificação, o produto obtido foi semelhante a *S. haematobium*. Assim, foram selecionadas 6 amostras para sequenciamento.

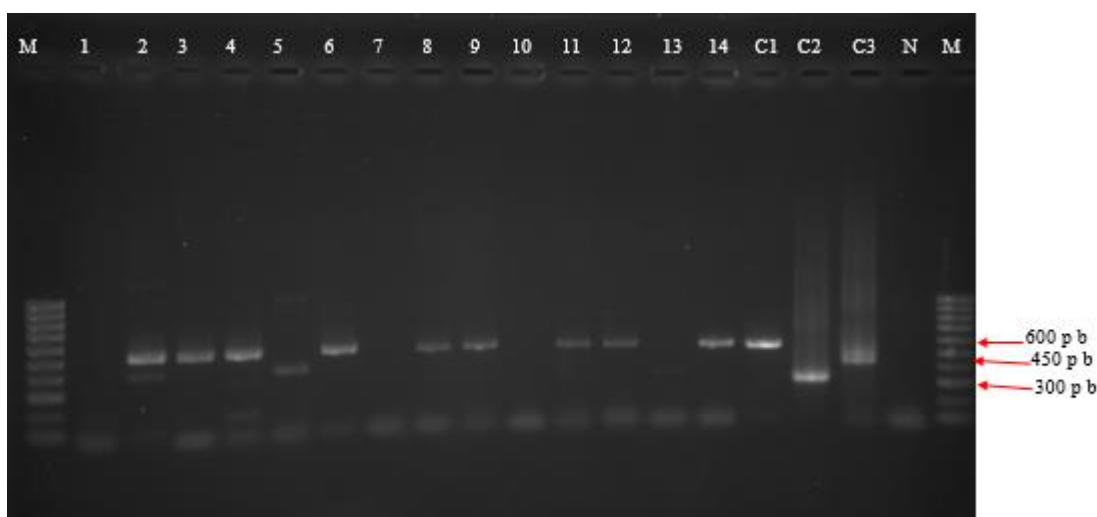


Figura 13. Produtos de amplificação de PCR multiplex de COI. Eletroforese em gel de agarose a 1.5%. M- Marcador molecular 1000pb (M); 1-14: Amostras A104, A111, A120, A122, A132, A134, A135, A141, A143, A155, A170, A184, A205 e A207. Controlos positivos: C1 - *S. haematobium*; C2 - *S. bovis* e C3 - *S. matthei*. N: controlo negativo.

4.3.3. Nested PCR multiplex de COI

Desenvolveu-se esta técnica com objetivo de tentar aumentar a sensibilidade da técnica de PCR multiplex de COI para se poder confirmar a espécie das amostras que deram negativas para o multiplex, mas positivas para o marcador Dra1.

Para o desenvolvimento da amplificação em nested-PCR multiplex de COI testaram-se primers para amplificação de uma região de COI que incluísse a região amplificada por PCR multiplex. Inicialmente testou-se duas combinações de primers: nsh.F1 + nsh.R1, nsh.F2 + nsh.R2, para amplificar produtos esperados de 650 pb e 1010 pb. Algumas amostras não amplificaram e outras produziram várias bandas não específicas (Figura 14). Testou-se de seguida a combinação nsh.F2 e nsh.R1. As combinações nsh.F2 + nsh.R2, nsh.F2 + nsh.R1 produziram bandas específicas e únicas (Figura 15).

Foram analisadas as mesmas 28 amostras que para multiplex, e obteve-se amplificação em 14 amostras, dos quais 11 amostras eram da região cefalopodal (A111, A122, A134, A135, A141, A143, A145, A152, A154, A184 e A207) e três de hepatopâncreas (A120, A170 e A206) (Figura 16).

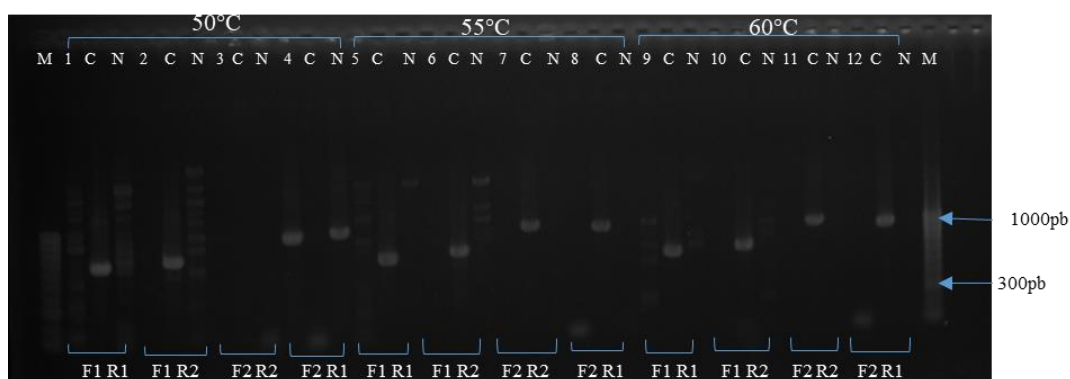


Figura 14. Otimização de PCR do marcador COI do parasita. Eletroforese em gel de agarose a 1.5%. M - Marcador; 1 - 12 correspondem à amostra A10; C – Controlo positivo (parasita) e N - Controlo negativo.

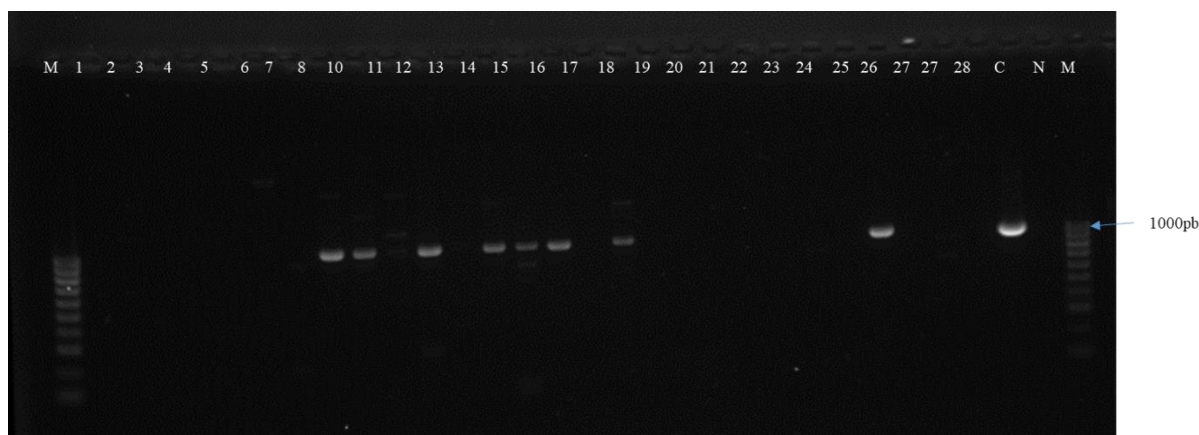


Figura 15. Produto de amplificação de PCR COI do parasita, com primers nsh.F2 e nsh.R2. Eletroforese em gel de agarose a 1.5%. M - Marcador. 1-28: Amostras A102, A104, A111, A120, A122, A124, A132, A134, A135, A141, A143, A145, A152, A155, A170, A180, A184, A196, A201, A205, A206, A208, A209, A210; C – Controlo positivo e N – Controlo negativo.

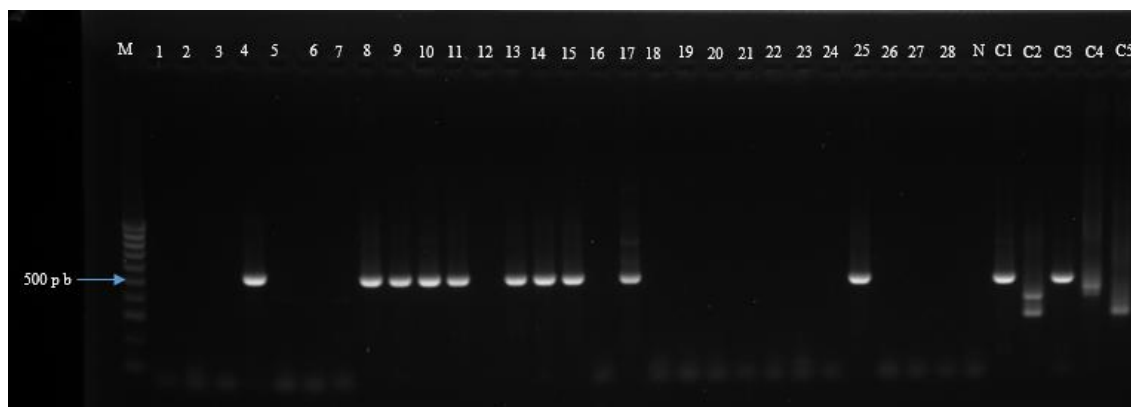


Figura 16. Nested PCR multiplex de COI. Visualização do gel de agarose a 1.5%. M – Marcador. 1-28: Amostras A102, A104, A111, A120, A122, A124, A132, A134, A135, A141, A145, A152, A155, A170, A180, A184, A196, A201, A202, A203, A204, A205, A206, A207, A208, A209 e A210. N - controlo negativo. Controlos positivos: C1 - *S. haematobium* diluído 1:100; C2 - *S. matheei*, *S. bovis* e *S. haematobium*; C3 - *S. haematobium*; C4 - *S. matheei* e C5 - *S. bovis*.

4.3.4. Análise filogenética de *S. haematobium*

Foram sequenciadas quatro amostras, das quais três eram da região cefalopodal (A135, A141 e A207) e uma (A170) de hepatopâncreas, de diferentes caracóis. Estas sequências foram submetidas ao GenBank, com os códigos MK293621-4, respetivamente, para A135, A141, A170 e A207.

Na árvore filogenética construída a partir das sequências de COI para parasita do género *Schistosoma*, usando o algoritmo Neighbor –Joining, com modelo mais apropriado para os dados, Tamura-Nei, as sequências obtidas neste trabalho agruparam com outras sequências da espécie *S. haematobium*, com um valor alto de bootstrap (99%). O genótipo da amostra A141 é comum a várias outras amostras de diferentes países africanos e incluindo uma sequência de híbrido *S. haematobium* x *S. bovis* da Córsega, enquanto que as amostras A135 e A170 apresentam polimorfismos (Figura 17 e 18). Os valores de bootstrap dentro do grupo *S. haematobium* são baixos (<80%).

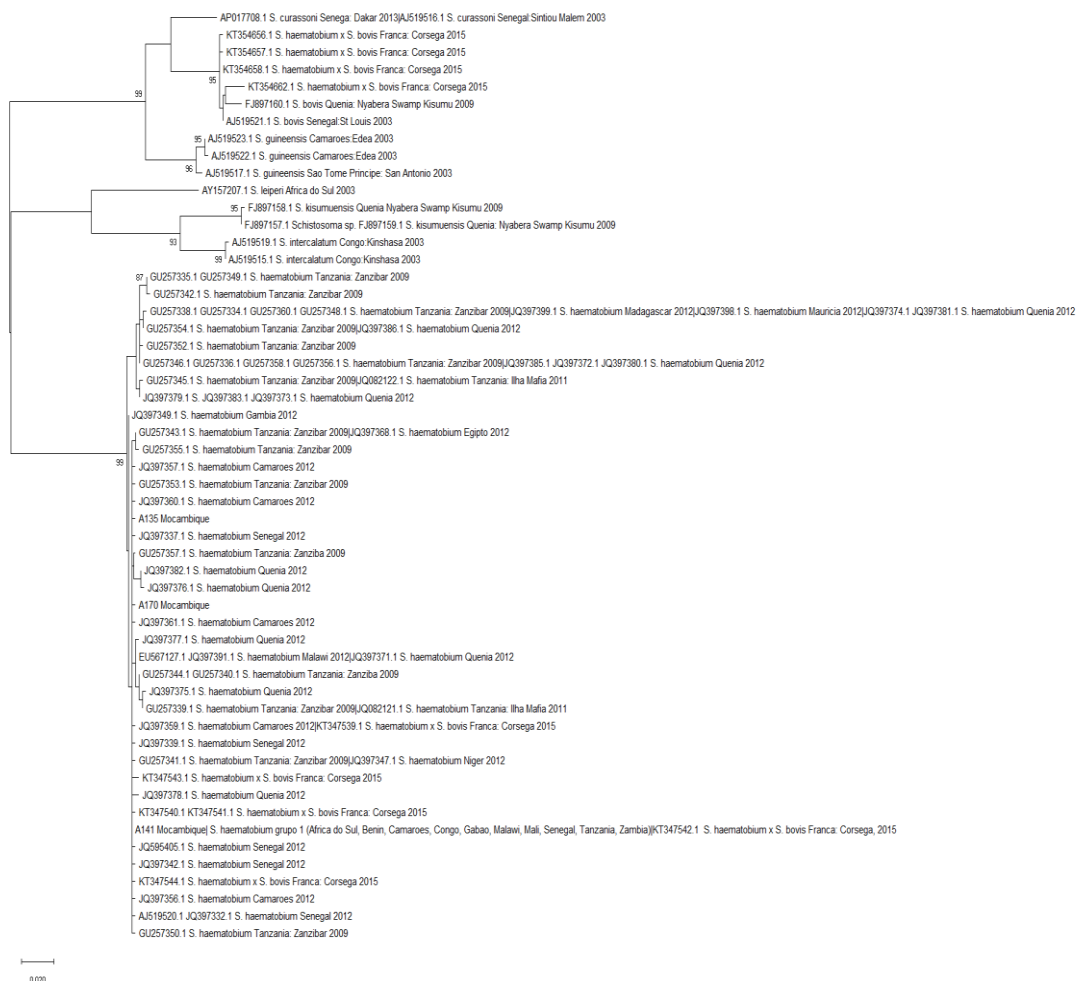


Figura 17. Árvore filogenética de COI de *S. haematobium*. Programa Mega X, usando o algoritmo de Neighbor-Joining com distâncias calculadas através do coeficiente de Tamura – Nei. Teste de bootstrap com 1000 réplicas, apresentando valores acima de 85%. “*S. haematobium* grupo 1”: *S. haematobium*: DQ157222.2 (Mali*), 2006; EU567128.1 Malawi, 2008; KY967520.1 Congo, 2017; KT354659.1 Gabão: Ekouk, 2015; KT354661.1 Benin: Toho, 2015; KT354660.1 Gabão: Melen, 2015; GU257359.1, GU257347.1, GU257337.1, GU257351.1 Tanzânia: Zanzibar, 2009; AY157209.1 Mali, 2002; JQ397397.1, África do Sul, 2012; JQ397330.1 Senegal, 2012; JQ397362.1, Q397358.1 Camarões, 2012; JQ397344.1 Mali, 2012; JQ397341.1 Senegal, 2012; JQ397394.1, JQ397393.1 Zâmbia, 2012

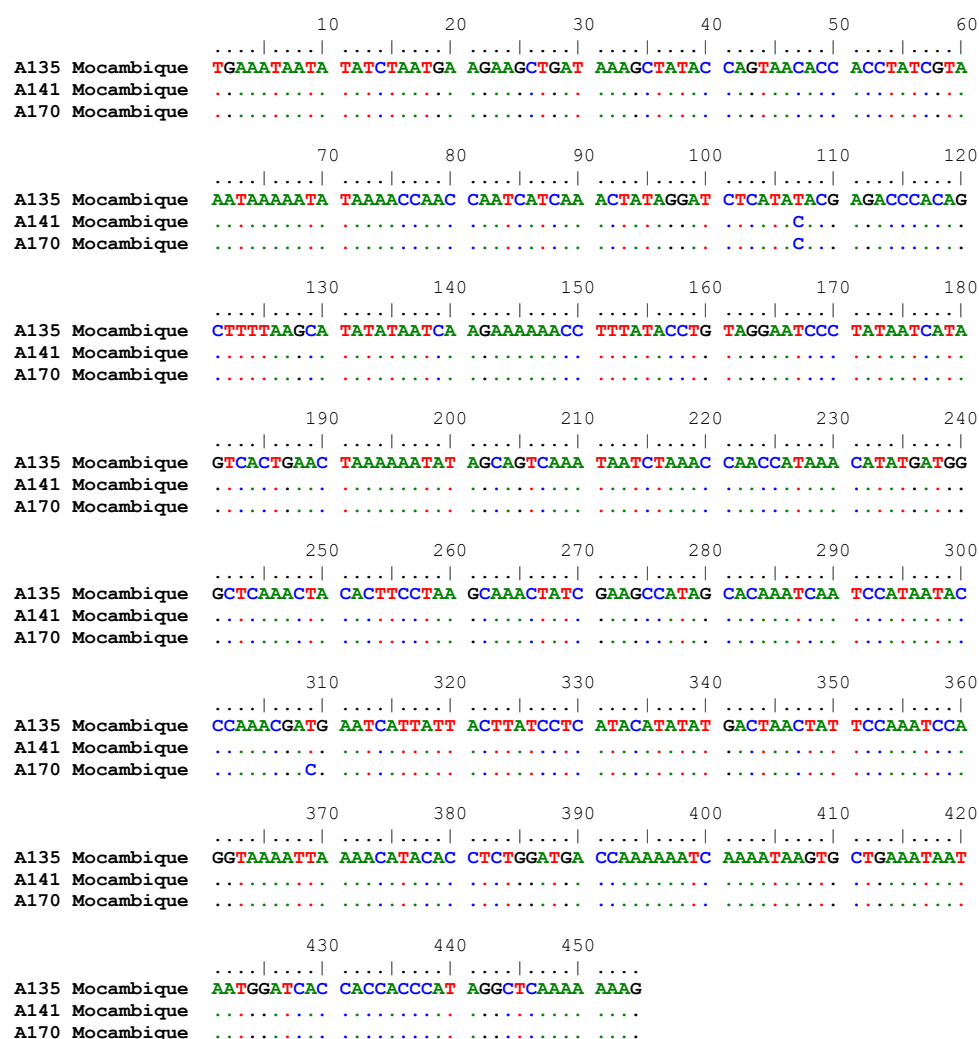


Figura 18. Alinhamento de sequenciação do produto de amplificação por PCR COI mostrando as regiões polimórficas.

Capítulo 5 - Discussão e conclusão

5.1. Discussão

A schistosomose urinária é endêmica em Moçambique, com grande impacto a nível de saúde pública (Phillips *et al.*, 2018). A província da Zambézia é a terceira do país com maior taxa de prevalência (60.1%) (Gerito *et al.*, 2009), tendo o distrito de Gurué uma taxa de prevalência de 47.1%, de acordo com um estudo realizado por Alfredo (2016) intitulado “Controlo pós-terapêutico da schistosomose e das parasitoses intestinais e atualizações da situação malacológica nos distritos de Quelimane e Gurué”.

Em Moçambique o primeiro estudo morfológico dos moluscos hospedeiros intermediários de *Schistosoma* foi realizado por Azevedo *et al.* (1954), na região sul do país. Este estudo sobre a biodiversidade dos caracóis, detetou a existência dos géneros *Lymnea*, *Physopsis*, *Bulinus*, *Biomphalaria*, *Pirgophyla* e *Segmentina*. Desde esse estudo até hoje não há registo conhecido de outro inquérito de diversidade malacológica no país. Para além disso, não existem dados sobre a diversidade genética de populações do género *Bulinus* de Moçambique.

O presente estudo aprofundou os resultados do projeto de Mestrado de Célio Alfredo (2016) que teve como um dos objectivos detectar a infecção por *S. haematobium*, agente causador da schistosomose urinária, em *Bulinus* sp, no distrito de Gurué. Em particular, o presente estudo teve como objetivo identificar e estudar a diversidade genética deste parasita e do seu hospedeiro intermediário, moluscos do género *Bulinus*, através de métodos moleculares.

Inicialmente, amplificou-se o DNA de caracol através de um marcador nuclear (ITS) e um marcador mitocondrial (COI), para verificar a qualidade do DNA extraído e caracterizar as populações de caracóis. Todas as amostras amplificaram pelo menos para um dos marcadores. Contudo, oito não amplificaram para ITS (duas amostras da região Mutxora e seis da Barragem) e cinco não amplificaram para COI (todas as amostras eram da região Mutxora). As amostras que não amplificaram eram da região de hepatopâncreas, o que pode ter sido causado pela presença de inibidores, visto ser uma região rica em lípidos e resíduos de digestão. Estes resultados mostram que será preciso cuidado com a utilização de amostras extraídas de hepatopâncreas ou que incluam esta região do corpo do caracol, sendo que se obtém amplificação mais fiável a partir de amostras de DNA

extraído da região cefalopodal.

As sequências de produtos obtido por PCR de ITS e de COI de caracóis das duas populações apresentaram polimorfismos entre estas duas populações, mas as sequências obtidas de COI foram indistinguíveis dentro da mesma população. Estes dados sugerem separação genética entre as duas populações e ausência ou baixa migração. Contudo, a amostragem era reduzida a nível de representatividade da distribuição de caracóis e a nível de número de sequências, sendo necessário estudos mais aprofundados e alargados que incluam mais caracóis da região e mais dados genéticos para estudos populacionais. Comparando as sequências obtidas de ITS e COI dos caracóis com outras sequências de *Bulinus* sp retiradas da base de dados GenBank notou-se muitas regiões polimórficas. Na análise filogenética observou-se valores elevados de bootstrap (<85%) para o gene COI e valores baixos de bootstrap (>69%) para a região ITS, mostrando assim maior robustez dos resultados de COI em relação a ITS. A combinação das análises filogenéticas de ITS e COI permitiu identificar estas populações de caracóis como *B. globosus* e sugerem que estão mais próximas de populações da Tanzânia, e seguidamente da África do Sul e Quênia, sendo os resultados dos dois marcadores congruentes para valores de bootstrap superiores a 85 %. Estes resultados sugerem movimentos migratórios de *B. globosus* no Sul-Este Africano, mas o número reduzido de amostras e regiões amostradas não permite obter conclusões sobre a direção dessas migrações. Neste estudo, o marcador mitocondrial (COI) forneceu uma estimativa mais precisa da história evolutiva à semelhança de outros estudos (Kane *et al.*, 2008), mas ao contrário de Jones *et al.* (2001) em que a região ITS mostrou ser filogeneticamente informativo ao nível de espécies do molusco e parasita do que gene COI.

Neste estudo foram examinados 105 caracóis, dos quais cinco faziam parte de um grupo que tinha eliminado cercárias, não tendo sido detetada eliminação de cercárias nos restantes 100. A região cefalopodal e hepatopâncreas foram estudados separadamente para cada caracol. Efetuou-se a detecção do parasita *Schistosoma* com PCR para a região repetitiva Dra I, tendo-se obtido uma taxa de infecção mais alta (7.7 %) na região cefalopodal do que no hepatopâncreas (1.96 %). Estes resultados sugerem que a maior parte dos moluscos com infeção pré-patente (infetados, mas sem libertar cercárias) tinha uma infeção recente, ainda circunscrita à fase inicial de infeção na região cefalopodal.

Não foram encontrados estudos que comparem a taxa de infecção entre as duas regiões do corpo do caracol, mas os resultados obtidos neste trabalho sugerem que será importante em estudos de dinâmica de transmissão da schistosomose.

Não foram aqui detetados caracóis infetados através de métodos moleculares no rio Mutxora, mas detetou-se uma prevalência de 36% na região de Barragem. Estes valores são, respetivamente mais baixos e mais altos do que os encontrados por Célio Alfredo no seu projeto de Mestrado, que encontrou uma taxa de infecção de caracóis através do teste de eliminação de cercárias de 1.37% (0.00 – 3.26) do rio Mutxora e de 1.98% (0.06 – 3.91) para região de Barragem, valores estes estimados estatisticamente a partir do número de grupos de moluscos positivos reportados. Estes resultados de diferentes taxas de infecção pré-patente e patente estão de acordo com alguns estudos em que se usou métodos de deteção por libertação de cercárias e moleculares. No estudo realizado por Hassan *et al.*, 2016, em que 28.28 % dos moluscos não eliminaram cercárias e 38.98 % foram positivas para triagem de PCR, no estudo realizado nas barragens de Erinle e Eko-Ende em Nigéria. Houve uma diferença estatisticamente significativa no estado de infecciosidade determinado pela eliminação de cercárias e pela técnica de PCR ($p = 0,05$). Observações semelhantes foram descritas por Allan *et al.* (2013) e Hamburger *et al.* (2004), ao observar que níveis de infecção detectados por PCR usando PCR de Dra I foram consistentemente mais altos (40 a 100%) nos moluscos que não eliminaram cercárias.

No caso em que a taxa de infecção patente é inferior à pré-patente, como foi aqui encontrado para Barragem, pode ser explicada por os caracóis terem altos níveis de exposição ao parasita, mas essas infecções muitas vezes não evoluírem para a patência. Isso pode ser devido à incompatibilidade de determinadas combinações de hospedeiro e parasita, à longevidade dos moluscos ou a uma combinação desses efeitos (Allan *et al.*, 2013). Contudo, não será de excluir a possibilidade de que esta população de caracóis tenha sofrido uma exposição ao parasita mais intensa recentemente. Por outro lado, no caso em que a taxa de infecção pré-patente foi inferior à patente (rio Mutxora) poderá ser devido a ter havido um período de infecção há mais tempo, mas que foi interrompido e não haver infecções recentes. Neste trabalho não foi possível testar os grupos positivos para libertação de cercárias no rio Mutxora para confirmar a espécie de tremátode

infetante, pelo que há ainda a possibilidade de os moluscos estarem infetados com tremátodes de uma espécie não detetada pelos métodos moleculares aqui usados.

Apenas se detetou DNA do parasita ou na região cefalopodal ou no hepatopâncreas, o que tem implicações a nível de deteção molecular de infeção. Apesar de mais baixa do que na região cefalopodal, a taxa de infeção detetada só em hepatopâncreas corresponde a cerca de 11 % da taxa de infeção total (11% para um total de 36%). Assim, e apesar da região de hepatopâncreas ser de maior dificuldade de amplificação, possivelmente devido à presença de inibidores (como discutido acima), será de recomendar que, para identificação de todas as infeções pré-patentes, deverá ser incluída a região de hepatopâncreas na análise. Esta região poderá ser incluída em conjunto ou separadamente da região cefalopodal, dependendo do objetivo do estudo, respetivamente, se só a taxa de infeção geral ou se também o estadió de infeção no caracol.

Em relação à taxa de positividade entre as duas populações de caracóis verificou-se que a população de moluscos da região da Barragem tinha uma taxa de infeção mais alta do que no rio Mutxora. Assim, será necessário adotar medidas de controlo mais intensivas a nível da comunidade que vive ao redor ou faz uso da Barragem tais como: vigilância epidemiológica, sensibilização da população para não tomar banho, lavar roupas, beber água, pescar ou utilizar a água para suas actividades agrícolas, pelo menos nas horas de maior calor e luminosidade.

Uma desvantagem de usar a região repetitiva Dra I como marcador é de que o produto de PCR é muito pequeno e não permite identificar com certeza a espécie de parasita dentro das espécies próximas de *S. haematobium*, particularmente em áreas co-endêmicas com parasitas não humanos. Assim, para identificar a espécie do parasita *Schistosoma*, agente causador da schistosomose urinária foi utilizado um método de PCR multiplex de COI, em PCR único (Webster *et al.*, 2010) e em nested PCR desenvolvido no âmbito deste projeto. De acordo com os resultados obtidos, comparando o tamanho dos produtos obtidos para as amostras com os controlos para *S. haematobium* e os controlos artificiais de *S. bovis* e *S. matthei*, observou-se que o parasita pertence a espécie *S. haematobium*.

Em relação à sensibilidade das três técnicas na detecção da infecção do caracol *por S. haematobium*, o PCR da região Dra I, PCR multiplex e nested PCR, constatou-se que o primeiro mostrou ser mais sensível que os outros dois métodos. Segundo Hamburger *et al.* (2001, 2004) a região repetitiva Dra I é uma ferramenta útil para identificar áreas de transmissão e infecções pré-patentes nos caracóis. Contudo, será recomendável que a identificação do parasita infetante seja confirmada por outro método, principalmente em regiões co-endêmicas com outros parasitas zoonóticos, ou onde se desconhece a espécie predominante.

Através de sequenciação de COI do parasita detetaram-se polimorfismos na população, num total de três haplótipos, e confirmaram a identificação como *S. haematobium*, em alinhamento e análise filogenética. Um dos haplótipos é indistinguível de uma sequência bastante comum em diferentes regiões africanas desde o Este ao Oeste, incluindo na África do Sul e híbridos de *S. haematobium* x *S. bovis* da Córsega, indicando uma grande dispersão desta linhagem mitocondrial do parasita. Os dois haplótipos poderão ter tido origem por mutação na população em estudo ou ter sido introduzidos por migração de outras regiões. Para se avaliar a taxa de migração dever-se-ia analisar mais marcadores (por exemplo microssatélites) e um maior número de caracóis.

Em conclusão, neste trabalho determinou-se que os moluscos colhidos nas duas populações de Gurué, Barragem e rio Mutxora, pertencem à espécie *B. globosus* e o parasita infetante à espécie *S. haematobium*. A região com maior taxa de infecção do hospedeiro intermediário foi da Barragem, com transmissão corrente, ao contrário do rio Mutxora, em que parece não haver infecção recente, à altura das colheitas. Estes dados poderão ser úteis para informar as autoridades do governo distrital quanto a decidir quanto a medidas de controlo e prevenção a nível da comunidade de Gurué. O uso de técnicas moleculares de detecção e identificação do parasita no caracol permitiu detetar infecção pré-patente, estabelecer a fase de desenvolvimento do parasita, e identificar a espécie deste. Contudo, a técnica de PCR de Dra1 será mais útil detecção com maior sensibilidade do parasita, no contexto de inquéritos epidemiológicos. Contudo, para identificação do parasita em circulação no hospedeiro intermediário, particularmente em relação a espécies zoonóticas próximas em situações de co-endemicidade, deverá ser utilizado o

PCR multiplex de COI. Identificou-se diversidade genética tanto a nível da população de caracóis como de parasitas, dentro da população de Gurué e em relação a outros países africanos. Os avanços na identificação de parasitas podem ajudar a elucidar padrões de transmissão, especificidade do hospedeiro intermediário e interações entre parasitas intimamente relacionados.

Referências Bibliográficas

- Adenowo, A. F., Oyinloye, B. E., Ogunyinka, B. I. e Kappo, A. P. (2015) 'Impact of human schistosomiasis in sub-Saharan Africa', *Braz J Infect Dis*, 19(92):196–205.
- Akinwale, O. P., Kane, R. a, Rollinson, D., Stothard, J. R., Ajayi, M. B., Akande, D. O., Ogungbemi, M. O., Duker, C., Gyang, P. V and Adeleke, M. a (2011) 'Molecular approaches to the identification of *Bulinus* species in south-west Nigeria and observations on natural snail infections with schistosomes.' *J Helminthol*. 85(3):283–293.
- Alfredo, C. (2016). 'Controlo pós-terapêutico da schistosomose e das parasitoses intestinais e atualização da situação malacológica nos distritos de Quelimane e Gurué , na província da Zambézia - Moçambique.' Universidade Nova de Lisboa.
- Allan, F., Dunn, A. M., Emery, A. M., Stothard, J. R., Johnston, D. A., Kane, R. A., Khamis, A. N., Mohammed, K. A. e Rollinson, D. (2013) 'Use of sentinel snails for the detection of *Schistosoma haematobium* transmission on Zanzibar and observations on transmission patterns'. *Acta Trop*. 128:234–240.
- Angeli, V., Faveeuw, C., Roye, O., Fontaine, J., Teissier, E., Capron, A., Wolowczuk, I., Capron, M. e Trottein, F. (2001) 'Role of the Parasite-derived Prostaglandin D 2 in the Inhibition of Epidermal Langerhans Cell Migration during Schistosomiasis Infection.' *J Exp Med*. 193(10):1135-47
- Azinhais, P., Silva, L., Conceição, P., Pereira, B., Borges, R., Leão, R., Brandão, Á. e Sobral, T. (2009) 'Schistosomíase Urinária: Um Caso Clínico diagnosticado em Portugal', *Acta Urologica*, 26(3):55–62.
- Berry A, Moné H, Iriart X, Mouahid G, Aboo O, Boissier J, Fillaux J, Cassaing S, Debuissou C, Valentin A, Mitta G. e Théron A, M. J. (2014) '*Schistosomiasis haematobium*, Corsica, France.' *Emerg Infect Dis*. 20(9):1595–7.
- Boissier, J., Moné, H., Mitta, G., Bargues, M. D., Molyneux, D. e Mas-Coma, S. (2015) 'Schistosomiasis reaches Europe'. *Lancet Infect Dis*. 15(7):757–758.

- Boon, N. A. M., Fannes, W., Rombouts, S., Polman, K., Volckaert, F. A. M. e Huyse, T. (2017) 'Detecting hybridization in African schistosome species : does egg morphology complement molecular species identification ?' *Parasitol.* 144(7):954-964
- Botelho, M. C., Ferreira, P. O., Alves, H. and Richter, J. (2016) 'Epidemiology and pathology of bovine schistosomiasis in Mozambique', 5th Annual Meeting i3S - Instituto de Investigação e Inovação em Saúde, Universidade do Porto. 3-4 Novembro 2016, Póvoa do Varzim, Portugal.
- Bustinduy, A. L. e King, C. H. 'Schistosomiasis.' In: Farrar, J., Hotez, P. J., Junghanss, T., Kang, G., Lalloo, D. e White, N. J., eds. *Manson's Tropical Disease*. 23rd ed. Elsevier; Philadelphia, PA, USA:698-725.
- Cantanhede, S. P. D., Marques, A. de M. and Silva-Sousa, Neuton, A. A. L. (2008) 'Atividade moluscicida de plantas: uma alternativa profilática', *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 10(2):282-288.
- Carvalho, O. S., Jannotti-Passos, L. K., Caldeira, R. L. (2008). 'Importância epidemiológica e biologia molecular aplicada ao estudo dos moluscos do gênero *Biomphalaria*.' In: Carvalho, O. S., Coelho, P. M. Z., Lenzi, H. L. *Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar*. Fiocruz, Rio de Janeiro:311-145.
- Chen, L., Rao, K. V. N., He, Y.-X. and Ramaswamy, K. (no date) 'Skin-stage Schistosomula of *Schistosoma mansoni* Produce an Apoptosis-inducing Factor That Can Cause Apoptosis of T Cells *'. doi: 10.1074/jbc.M201344200.
- Chitsulo, L., Engels, D., Montresor, A. and Savioli, L. (2000) 'The global status of schistosomiasis and its control', 77, pp. 41–51.
- Colley, D. G., Bustinduy, A. L., Secor, W. E. e King, C. H. (2014) 'Human schistosomiasis'. *Lancet*. 383(9936):2253–2264.
- Correia, D. D. S. (2011) *Moluscos Hospedeiros intermediarios de Trematodes: Estudo Molecular de Helisoma sp. (Gastropoda; Planorbidae) de Diferentes Áreas Geograficas*. Universidade Nova de Lisboa

- Direção Nacional da Administração Local (2005). 'Perfil do Distrito de Gurué Província da Zambézia.' Série: Perfis Distritais de Moçambique. Ed. Ministério da Administração Estatal. 49 pp.
- Engels, D., Chitsulo, L., Montresor, A. e Savioli, L. (2002) 'The Global Epidemiological Situation of Schistosomiasis and New Approaches to Control and Research', *Acta Trop.* 2(82):139–146.
- Farrar, Jeremy; Hotez , Peter; Junghanss, Thomas; Kang, Gagandeep; Lalloo, David; White, N. (2014) *Manson 's Tropical Diseases*. 23rd ed. Elsevier IE. 1360 pp
- Feldmeier, H. e Poggensee, G. (1993) 'Diagnostic techniques in schistosomiasis control. A review', *Acta Trop.*, 52(4):205–220.
- Figueiredo, J. T. G. C. de M. (2014) 'Lesões causadas pelos ovos de *Schistosoma haematobium* como fator de risco em doenças crônicas urinárias das zonas endêmicas de Angola.' Universidade Nova de Lisboa. 124 pp.
- Gerito, A., Rassul, N., Verónica, C. e Acácio, S. (2009) 'Geographic Distribution and Prevalence of Schistosomiasis and Soil-Transmitted Helminths among Schoolchildren in Mozambique', *Am J Trop Med Hyg*, 81(5):799–803.
- Gryseels, B. (2012) 'Schistosomiasis'. *Infect Dis Clin North Am.*, 26:383–397.
- Gryseels, B., Polman, K., Clerinx, J. e Kestens, L. (2006) 'Human schistosomiasis'. *Lancet*. 368(9541):1106-18.
- Gujral, L. e Vaz, R. G. (2000) 'Prevalência, comportamentos de risco e níveis de informação sobre a esquistossomose urinária em escolares da Área de Saúde 1º de Junho, na Cidade de Maputo, Moçambique'. *Cad. Saúde Pública*. 16(1):43–50.
- Hall, T. A. (1999) 'BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.', *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*. 41:95-98.
- Hamburger, J., Abbasi, I., Ramzy, R. M., Jourdane, J. e Ruppel, A. (2001) 'Polymerase Chain Reaction assay Based on a highly repeated sequence of *Schistosoma haematobium*:

A potential tool for monitoring Schistosoma-infested water'. *Am J Trop Med Hyg.* 65(6): 907–911.

Hamburger, J., Hoffman, O., Kariuki, H. C., Muchiri, E. M., Ouma, J. H., Koech, D. K., Sturrock, R. F. e King, C. H. (2004) 'Large-scale, Polymerase Chain Reaction–based surveillance of *Schistosoma haematobium* DNA in snails from transmission sites in coastal Kenya: a new tool for studying the dynamics of snail infection'. *Am J Trop Med Hyg.* 7(6):765–773.

Jones, C. S., Rollinson, D., Mimpfoundi, R., Ouma, J., Kariuki, H. C. e Noble, L. R. (2001) 'Molecular evolution of freshwater snail intermediate hosts within the *Bulinus forskalii* group.', *Parasitol.* 123:S277-92.

Jorgensen, A., Stothard, J. R., Madsen, H., Nalugwa, A., Nyakaana, S. e Rollinson, D. (2013) 'The ITS2 of the genus *Bulinus*: Novel secondary structure among freshwater snails and potential new taxonomic markers'. *Acta Trop.* 128:218–225.

Junior, G. B. da silva, Duarte, D. B., Barros, E. J. G. e Daher, E. de F. (2013) 'Schistosomiasis-associated kidney disease: A review', *Asian Pac J Trop Dis.* 3(1):79–84.

Kane, R. A. e Rollinson, D. (1994) 'Repetitive sequences in the ribosomal DNA internal transcribed spacer of *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma intercalatum* and *Schistosoma mattheei*'. *Mol Biochem Parasitol.* 63(1): 153–156.

Kane, R. A., Stothard, J. R., Emery, A. M. e Rollinson, D. (2008) 'Molecular characterization of freshwater snails in the genus *Bulinus*: a role for barcodes?' *Parasit Vectors.* 1(1):15.

King, C. L., Malhotra, I., Mungai, P., Wamachi, A., Kioko, J., Muchiri, E. e Ouma, J. H. (2001) '*Schistosoma haematobium*-Induced Urinary Tract Morbidity Correlates with Increased Tumor Necrosis Factor- α and Diminished Interleukin-10 Production', *J Infect Dis.* 184:1176–82.

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. e Tamura, K. (2018) 'MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Across Computing Platforms', *Mol Biol Evol.* 35:1547–1549.

- Lorenzoni, C., Oliveras, L., Vilajeliu, A., Carrilho, C., Ismail, M. R., Castillo, P., Augusto, O., Sidat, M., Menéndez, C., Garcia-Basteiro, A. L. e Ordi, J. (2018) 'Weak surveillance and policy attention to cancer in global health: the example of Mozambique Analysis', *BMJ Glob Health*, 3:654.
- Lucas, R. e Santos, F. (2016) 'Morphology of the mollusc', *Revista Maiêutica, Indaial*, (47):15–24.
- Gaspar, M. C, Chipembe, C. S., Maunze, X. H., Schoemaker, J., Mbofana, F., Mangué, J., Alfeu. M., Zavale, O., Nhapurre, G. e Singano, C. C. (2011) 'Moçambique Inquérito Demográfico e de Saúde 2011'. Instituto Nacional de Estatística, Ministério da Saúde, Maputo, Moçambique. 412 pp
- McManus, D. P., Dunne, D. W., Sacko, M., Utzinger, J., Vennervald, B. J. e Zhou, X. N. (2018) 'Schistosomiasis', *Nat Rev Dis Primers*, 4(1): 1–19.
- Muchangos, A. dos (1999) Moçambique Paisagens e Regiões Naturais. Tipografia Globo, Lda, Maputo. 163 pp.
- Mutapi, F., Mduluza, T., Gomez-Escobar, N., Gregory, W. F., Fernandez, C., Midzi, N. e Maizels, R. M. (2006) 'Immuno-epidemiology of human *Schistosoma haematobium* infection: preferential IgG3 antibody responsiveness to a recombinant antigen dependent on age and parasite burden', *BMC Infectious Diseases*, 6(96):1–11.
- Neves, D., Melo, A., Linardi, P. e Vitor, R. (2011) *Parasitologia Humana*. 12ª Edição. Atheneu, S. Paulo. 264 pp
- Phillips, A. E., Gazzinelli-Guimarães, P. H., Aurelio, H. O., Dhanani, N., Ferro, J., Nala, R., Deol, A. e Fenwick, A. (2018) 'Urogenital schistosomiasis in Cabo Delgado, northern Mozambique: baseline findings from the SCORE study'. *Parasit Vectors*. 11:30.
- Pitchford, R. J. (1977) 'A check list of definitive hosts exhibiting evidence of the genus *Schistosoma* Weinland , 1858 acquired naturally in Africa and the Middle East', *J Helminthol*. 51:229–252.
- Reis, R. J. N., Ferreira, A. L., Ferreira, J. J. e Salazar, H. C. (1984) 'Esquistossomose

mansonii: diagnóstico pela biópsia retal e parasitológico em 100 casos selecionados', *Revista Brasileira de Colo-Proctologia*, 4:99–101.

Rey, L. (1987) 'Estratégias e métodos de controle da esquistossomose', 3: 38-55.

Rey, L. (2010) 'Bases da Parasitologia Médica'. 3ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 427 pp.

Rollinson, D., Walker, T. K. e Simpson, A. J. G. (1986) 'The application of recombinant DNA technology to problems of helminth identification', *Parasitol.* 91:53–71.

Rosa, A. J. M. e Paiva, S. R. (2009) 'Marcadores Moleculares e suas Aplicações em Estudos Populacionais de Espécies de Interesse Zootécnico'. Embrapa Cerrados, Planaltina, Brasil. 35 pp.

Saitou, N. e Nei, M. (1987) 'The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees.' *Mol Biol Evol.* 4(4):406-25

Salzet, A. C. M. e Stefano, G.B. (2000) 'Molecular Crosstalk in Host–Parasite Relationships: Schistosome– and Leech–Host Interactions.' *Parasitol Today.* 16(12): 536-540.

Singh, K., Muddasiru, D. e Singh, J. (2016) 'Current status of schistosomiasis in Sokoto, Nigeria', *Parasite Epidemiol Control.* 1(3):239–244.

Soriano, J. L. (2004) 'Técnicas de Biología Molecular Aplicadas a la Taxonomía y Filogenia de Moluscos', *Spira*, 1:23–33.

Souza, D., Falcão, A. C. M. G., Gargioni, C., Kanamura, H. Y., Ciaravolo, R. M. C., Eduardo, M. B. P. (2007) 'Vigilância Epidemiológica e controle da esquistossomose: normas e instruções.' 1ª ed. Centro de Vigilância 99 Epidemiológica Prof. Alexandre Vranjac, São Paulo. 56pp. Disponível em <http://www.cve.saude.sp.gov.br>, Acessado em 11/03/2018.

Stothard, J., Llewellyn-Hughes, J., Griffin, C., Hubbard, S., Kristensen, T. e Rollinson, D. (2002) 'Identification of Snails within the *Bulinus africanus* Group from East Africa

by Multiplex SNaPshot™ Analysis of Single Nucleotide Polymorphisms within the Cytochrome Oxidase Subunit I', *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 97:31–36.

Stothard, J. R., Hughes, S. e Rollinson, D. (1996) 'Variation within the Internal Transcribed Spacer (ITS) of ribosomal DNA genes of intermediate snail hosts within the genus *Bulinus* (Gastropoda: Planorbidae)', *Acta Trop.*, 61:19–29.

Utzing, J., N'Goran, E. K., Caffrey, C. R. e Keiser, J. (2011) 'From innovation to application: Social-ecological context, diagnostics, drugs and integrated control of schistosomiasis'. *Acta Trop.*, 120(Supl. 1): S121-37

Utzing, J., Raso, G., Brooker, S., De Savigny, D., Tanner, M., Ørnbjerg, N., Singer, B. H. e N'goran, E. K. (2009) 'Schistosomiasis and neglected tropical diseases : towards integrated and sustainable control and a word of caution', *Parasitol.* 13:1859–1874.

Velez, A. H. C. (2010) 'Bioecologia e caracterização molecular de *Bulinus globosus* de Angola'. Universidade Nova de Lisboa - Instituto de Higiene e Medicina Tropical.

Vidigal, T. H. D. A., Magalhaes, K. G. e Carvalho, O. dos S. (2004) 'Polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis of the ITS2 region for differentiation of Brazilian *Biomphalaria* intermediate hosts of the *Schistosoma mansoni*'. *Rev Soc Bras Med Trop.* 4:351–351.

Webster, B. L., Rollinson, D., Stothard, J. R. e Huyse, T. (2010) 'Rapid diagnostic multiplex PCR (RD-PCR) to discriminate *Schistosoma haematobium* and *S. bovis*', *J Helminthol.* 84(1):107–114.

Webster, B. L., Southgate, V. R., Timothy, D. e Littlewood, J. (2006) 'A revision of the interrelationships of *Schistosoma* including the recently described *Schistosoma guineensis*.' *Int J Parasitol Parasites Wildl.* 36(8), pp. 947–955.

WHO (2002) 'Prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis', *World Health Organization Technical Report Series*: 912, 57 pp.

Anexos

Anexo 1

Quadro 1. Coleção de amostras de caracóis do Departamento de Helminologia Médica do IHMT, com os respectivos resultados das análises.

ID	Habitat	Libertação de cercárias no grupo	Região	[DNA] ng/ul	Amplificação de DNA molusco			Detecção de DNA de parasita					
					ITS	ITS, 2ª banda	COI	PCR DraI			PCR multiplex COI		
								1º	2º	3º	PCR	Nested PCR F2 R2	Nested PCR F2 R1
A1	Mutxora - Gúroe	-	Cef	178.3	1	0	1	0	0	0			
A2	Mutxora - Gúroe	-	Cef	166.9	1	0	1	0	0	0			
A3	Mutxora - Gúroe	-	Cef	59.5	1	0	1	0	0	0			
A4	Mutxora - Gúroe	-	Cef	119.9	1	0	1	0	0	0			
A5	Mutxora - Gúroe	-	Cef	211.3	1	0	1	0	0	0			
A6	Mutxora - Gúroe	-	Hep	207.3	1	0	1	0	0	0			
A7	Mutxora - Gúroe	-	Hep	153.9	1	0	1	0	0	0			
A8	Mutxora - Gúroe	-	Hep	273.5	1	0	1	0	0	0			
A9	Mutxora - Gúroe	-	Hep	113.9	1	0	1	0	0	0			
A10	Mutxora - Gúroe	-	Hep	94.1	1	0	1	0	0	0			
A11	Mutxora - Gúroe	-	Cef	813.6	1	0	1	0	0	0			
A12	Mutxora - Gúroe	-	Cef	82.4	1	0	1	0	0	0			
A13	Mutxora - Gúroe	-	Cef	385.1	1	0	1	0	0	0			
A14	Mutxora - Gúroe	-	Cef	302	1	0	1	0	0	0			
A15	Mutxora - Gúroe	-	Cef	320.3	1	0	1	0	0	0			
A16	Mutxora - Gúroe	-	Hep	115.8	1	1	1	0	0	0			
A17	Mutxora - Gúroe	-	Hep	51.1	1	0	1	0	0	0			
A18	Mutxora - Gúroe	-	Hep	36.2	1	0	1	0	0	0			

A19	Mutxora - Gúroe	-	Hep	695.2	1	1	1	0	0	0			
A20	Mutxora - Gúroe	-	Hep	119.2	1	0	1	0	0	0			
A21	Mutxora - Gúroe	-	Cef	117.4	1	0	1	0	0	0			
A22	Mutxora - Gúroe	-	Cef	40.7	1	0	1	0	0	0			
A23	Mutxora - Gúroe	-	Cef	130.3	1	0	1	0	0	0			
A24	Mutxora - Gúroe	-	Cef	287.2	1	0	1	0	0	0			
A25	Mutxora - Gúroe	-	Hep	188.7	1	0	0	0	0	0			
A26	Mutxora - Gúroe	-	Hep	11.3	1	0	1	0	0	0			
A27	Mutxora - Gúroe	-	Hep	337.5	0	0	0	0	0	0			
A28	Mutxora - Gúroe	-	Hep	373.5	0	0	1	0	0	0			
A29	Mutxora - Gúroe	-	Hep	141.2	1	1	0	0	0	0			
A30	Mutxora - Gúroe	-	Cef	82.7	1	0	1	0	0	0			
A31	Mutxora - Gúroe	-	Cef	193.1	1	0	1	0	0	0			
A32	Mutxora - Gúroe	-	Cef	133.1	1	0	1	0	0	0			
A33	Mutxora - Gúroe	-	Cef	185	1	0	1	0	0	0			
A34	Mutxora - Gúroe	-	Cef	244.5	1	0	1	0	0	0			
A35	Mutxora - Gúroe	-	Cef	203.8	1	0	1	0	0	0			
A36	Mutxora - Gúroe	-	Cef	214	1	0	1	0	0	0			
A37	Mutxora - Gúroe	-	Cef	230.6	1	0	1	0	0	0			
A38	Mutxora - Gúroe	-	Cef	199.9	1	0	1	0	0	0			
A39	Mutxora - Gúroe	-	Cef	161.4	1	0	1	0	0	0			
A40	Mutxora - Gúroe	-	Hep	161.7	1	0	0	0	0	0			
A41	Mutxora - Gúroe	-	Hep	207.9	1	0	1	0	0	0			
A42	Mutxora - Gúroe	-	Hep	321	1	0	0	0	0	0			
A43	Mutxora - Gúroe	-	Hep	174	1	0	1	0	0	0			
A44	Mutxora - Gúroe	-	Hep	240.5	1	0	1	0	0	0			

A45	Mutxora - Gúroe	-	Hep	234.9	1	0	1	0	0	0			
A46	Mutxora - Gúroe	-	Cef	551.1	1	0	1	0	0	0			
A47	Mutxora - Gúroe	-	Cef	315.9	1	0	1	0	0	0			
A48	Mutxora - Gúroe	-	Cef	425.7	1	0	1	0	0	0			
A49	Mutxora - Gúroe	-	Cef	191.1	1	0	1	0	0	0			
A50	Mutxora - Gúroe	-	Cef	416.2	1	0	1	0	0	0			
A51	Mutxora - Gúroe	-	Cef	428.6	1	0	1	0	0	0			
A52	Mutxora - Gúroe	-	Hep	325.2	1	0	1	0	0	0			
A53	Mutxora - Gúroe	-	Hep	344.1	1	0	1	0	0	0			
A54	Mutxora - Gúroe	-	Hep	324	1	0	1	0	0	0			
A55	Mutxora - Gúroe	-	Hep	289.2	1	0	1	0	0	0			
A56	Mutxora - Gúroe	-	Hep	319.9	1	0	1	0	0	0			
A57	Mutxora - Gúroe	-	Cef	281.7	1	0	1	0	0	0			
A58	Mutxora - Gúroe	-	Cef	308.3	1	0	1	0	0	0			
A59	Mutxora - Gúroe	-	Cef	313.9	1	0	1	0	0	0			
A60	Mutxora - Gúroe	-	Cef	368.7	1	0	1	0	0	0			
A61	Mutxora - Gúroe	-	Cef	224.6	1	0	1	0	0	0			
A62	Mutxora - Gúroe	-	Cef	340.4	1	0	1	0	0	0			
A63	Mutxora - Gúroe	-	Cef	267.2	1	0	1	0	0	0			
A64	Mutxora - Gúroe	-	Hep	258.3	1	0	1	0	0	0			
A65	Mutxora - Gúroe	-	Hep	278.1	1	0	1	0	0	0			
A66	Mutxora - Gúroe	-	Hep	260.3	1	0	1	0	0	0			
A67	Mutxora - Gúroe	-	Hep	177.4	1	0	1	0	0	0			
A68	Mutxora - Gúroe	-	Hep	300	1	0	1	0	0	0			
A69	Mutxora - Gúroe	-	Hep	198.4	1	0	1	0	0	0			
A70	Mutxora - Gúroe	-	Hep	134	1	0	1	0	0	0			

A71	Mutxora - Gúroe	-	Cef	264.2	1	0	1	0	0	0			
A72	Mutxora - Gúroe	-	Cef	254.7	1	0	1	0	0	0			
A73	Mutxora - Gúroe	-	Cef	265.2	1	0	1	0	0	0			
A74	Mutxora - Gúroe	-	Cef	168.5	1	0	1	0	0	0			
A75	Mutxora - Gúroe	-	Cef	215.4	1	0	1	0	0	0			
A76	Mutxora - Gúroe	-	Hep	163.4	1	0	1	0	0	0			
A77	Mutxora - Gúroe	-	Hep	184.1	1	0	1	0	0	0			
A78	Mutxora - Gúroe	-	Hep	171	1	0	1	0	0	0			
A79	Mutxora - Gúroe	-	Hep	245.1	1	0	1	0	0	0			
A80	Mutxora - Gúroe	-	Hep	166.6	1	0	1	0	0	0			
A81	Mutxora - Gúroe	-	Cef	272.1	1	0	1	0	0	0			
A82	Mutxora - Gúroe	-	Cef	132.9	1	0	1	0	0	0			
A83	Mutxora - Gúroe	-	Cef	95.9	1	0	1	0	0	0			
A84	Mutxora - Gúroe	-	Cef	103.6	1	0	1	0	0	0			
A85	Mutxora - Gúroe	-	Cef	96.7	1	0	1	0	0	0			
A86	Mutxora - Gúroe	-	Hep	136.5	1	0	1	0	0	0			
A87	Mutxora - Gúroe	-	Hep	127.5	1	1	1	0	0	0			
A88	Mutxora - Gúroe	-	Hep	123.4	1	1	1	0	0	0			
A89	Mutxora - Gúroe	-	Hep	97.7	1	0	1	0	0	0			
A90	Mutxora - Gúroe	-	Hep	204.6	1	0	1	0	0	0			
A91	Mutxora - Gúroe	-	Cef	247.9	1	0	1	0	0	0			
A92	Mutxora - Gúroe	-	Cef	450.8	1	0	1	0	0	0			
A93	Mutxora - Gúroe	-	Cef	148.5	1	0	1	0	0	0			
A94	Mutxora - Gúroe	-	Cef	256.9	1	0	1	0	0	0			
A95	Mutxora - Gúroe	-	Cef	200	1	0	1	0	0	0			
A96	Mutxora - Gúroe	-	Hep	190.1	1	0	1	0	0	0			

A97	Mutxora - Gúroe	-	Hep	147.2	1	0	1	0	0	0			
A98	Mutxora - Gúroe	-	Hep	148.6	1	0	1	0	0	0			
A99	Mutxora - Gúroe	-	Hep	212.8	1	0	1	0	0	0			
A100	Mutxora - Gúroe	-	Hep	163.8	1	0	1	0	0	0			
A101	Lagoa -Barragem	-	Cef	566.5	1	0	1	0	0	0			
A102	Lagoa -Barragem	-	Cef	1202	1	0	1	0	0	1	0	0	0
A103	Lagoa -Barragem	-	Cef	395.6	1	0	1	0	0	0			
A104	Lagoa -Barragem	-	Cef	819.3	1	0	1	0	0	1	S h	0	0
A105	Lagoa -Barragem	-	Cef	660.3	1	0	1	0	0	0			
A106	Lagoa -Barragem	-	Hep	1002.7	1	0	1	0	0	0			
A107	Lagoa -Barragem	-	Hep	146.9	1	0	1	0	0	0			
A108	Lagoa -Barragem	-	Hep	457.4	1	0	1	0	0	0			
A109	Lagoa -Barragem	-	Hep	299.5	1	0	1	0	0	0			
A110	Lagoa -Barragem	-	Hep	299.5	1	0	1	0	0	0			
A111	Lagoa -Barragem	-	Cef	490.9	1	0	1	1	1	1	S h	0	S h
A112	Lagoa -Barragem	-	Cef	588	1	0	1	0	0	0			
A113	Lagoa -Barragem	-	Cef	702.4	1	0	1	0	0	0			
A114	Lagoa -Barragem	-	Cef	625.9	1	0	1	0	0	0			
A115	Lagoa -Barragem	-	Cef	253	1	0	1	0	0	0			
A116	Lagoa -Barragem	-	Hep	209.7	1	0	1	0	0	0			
A117	Lagoa -Barragem	-	Hep	265.9	1	0	1	0	0	0			
A118	Lagoa -Barragem	-	Hep	54.6	0	0	1	0	0	0			
A119	Lagoa -Barragem	-	Hep	169	1	0	1	0	0	0			
A120	Lagoa -Barragem	-	Hep	39.3	1	0	1	1	1	1	S h	S h	
A121	Lagoa -Barragem	-	Cef	483.2	1	0	1	0	0	0			
A122	Lagoa -Barragem	-	Cef	672.1	1	0	1	1	1	1	S h	0	S h

A123	Lagoa -Barragem	-	Cef	696.4	1	0	1	0	0	0			
A124	Lagoa -Barragem	-	Cef	687	1	0	1	1	1	1	S h	0	S h
A125	Lagoa -Barragem	-	Cef	714.7	1	0	1	0	0	0			
A126	Lagoa -Barragem	-	Hep	362	1	0	1	0	0	0			
A127	Lagoa -Barragem	-	Hep	102.2	0	0	1	0	0	0			
A128	Lagoa -Barragem	-	Hep	51.1	0	0	1	0	0	0			
A129	Lagoa -Barragem	-	Hep	87.3	0	0	1	0	0	0			
A130	Lagoa -Barragem	-	Hep	127.9	1	0	1	0	0	0			
A131	Lagoa -Barragem	-	Cef	670.4	1	0	1	0	0	0			
A132	Lagoa -Barragem	-	Cef	1001.7	1	0	1	1	1	1	S h	S. bovis	0
A133	Lagoa -Barragem	-	Cef	716.1	1	0	1	0	0	0			
A134	Lagoa -Barragem	-	Cef	57.8	1	0	1	1	1	1	S h	S h	
A135	Lagoa -Barragem	-	Cef	1371.9	1	0	1	1	1	1	S h	S h	S h
A136	Lagoa -Barragem	-	Hep	80.7	1	0	1	0	0	0			
A137	Lagoa -Barragem	-	Hep	692.3	1	0	1	0	0	0			
A138	Lagoa -Barragem	-	Hep	259.7	1	0	1	0	0	0			
A139	Lagoa -Barragem	-	Hep	482.2	1	0	1	0	0	0			
A140	Lagoa -Barragem	-	Hep	168.9	1	0	1	0	0	0			
A141	Lagoa -Barragem	-	Cef	860.7	1	0	1	1	1	1	S h	S h	
A142	Lagoa -Barragem	-	Cef	371.4	1	0	1	0	0	0			
A143	Lagoa -Barragem	-	Cef	982.8	1	0	1	1	1	1	S h	S h	
A144	Lagoa -Barragem	-	Cef	419.6	1	0	1	0	0	0			
A145	Lagoa -Barragem	-	Cef	408.9	1	0	1	1	1	1	S h	S h	
A146	Lagoa -Barragem	-	Hep	421.9	1	1	1	0	0	0			
A147	Lagoa -Barragem	-	Hep	197.7	1	1	1	0	0	0			
A148	Lagoa -Barragem	-	Hep	482.2	1	1	1	0	0	0			

A149	Lagoa -Barragem	-	Hep	440.1	0	0	1	0	0	0			
A150	Lagoa -Barragem	-	Hep	143.3	1	0	1	0	0	0			
A151	Lagoa -Barragem	-	Cef	598.5	1	0	1	0	0	0			
A152	Lagoa -Barragem	-	Cef	309.5	1	0	1	1	1	1	S h	S h	
A153	Lagoa -Barragem	-	Cef	951.6	1	0	1	0	0	0			
A154	Lagoa -Barragem	-	Cef	960.6	1	0	1	0	0	0			
A155	Lagoa -Barragem	-	Cef	902.9	1	0	1	1	0	0	S h	S h	
A156	Lagoa -Barragem	-	Hep	702.5	1	1	1	0	0	0			
A157	Lagoa -Barragem	-	Hep	251.2	1	1	1	0	0	0			
A158	Lagoa -Barragem	-	Hep	310.4	1	1	1	0	0	0			
A159	Lagoa -Barragem	-	Hep	279.5	1	1	1	0	0	0			
A160	Lagoa -Barragem	-	Hep	251	1	1	1	0	0	0			
A161	Lagoa -Barragem	-	Cef	962.5	1	1	1	0	0	0			
A162	Lagoa -Barragem	-	Cef	267.9	1	0	1	0	0	0			
A163	Lagoa -Barragem	-	Cef	1168.8	1	1	1	0	0	0			
A164	Lagoa -Barragem	-	Cef	893.1	1	1	1	0	0	0			
A165	Lagoa -Barragem	-	Cef	573.1	1	1	1	0	0	0			
A166	Lagoa -Barragem	-	Hep	340.4	1	1	1	0	0	0			
A167	Lagoa -Barragem	-	Hep	244.3	1	1	1	0	0	0			
A168	Lagoa -Barragem	-	Hep	296.9	1	1	1	0	0	0			
A169	Lagoa -Barragem	-	Hep	415.1	1	1	1	0	0	0			
A170	Lagoa -Barragem	-	Hep	147	1	1	1	1	1	1	S h	S h	
A171	Lagoa -Barragem	-	Cef	1785.7	1	1	1	0	0	0			
A172	Lagoa -Barragem	-	Cef	1118.3	1	1	1	0	0	0			
A173	Lagoa -Barragem	-	Cef	1142.8	1	1	1	0	0	0			
A174	Lagoa -Barragem	-	Cef	1367	1	1	1	0	0	0			

A175	Lagoa -Barragem	-	Cef	1003.5	1	1	1	0	0	0			
A176	Lagoa -Barragem	-	Hep	1117.1	1	1	1	0	0	0			
A177	Lagoa -Barragem	-	Hep	299	1	1	1	0	0	0			
A178	Lagoa -Barragem	-	Hep	427.8	1	1	1	0	0	0			
A179	Lagoa -Barragem	-	Hep	509.1	0	0	1	0	0	0			
A180	Lagoa -Barragem	-	Hep	847.7	1	1	1	1	1	1	0	0	0
A181	Lagoa -Barragem	-	Cef	299.4	1	1	1	0	0	0			
A182	Lagoa -Barragem	-	Cef	513.5	1	1	1	0	0	0			
A183	Lagoa -Barragem	-	Cef	941.1	1	1	1	0	0	0			
A184	Lagoa -Barragem	-	Cef	1063.6	1	1	1	1	1	1	S h	S h	
A185	Lagoa -Barragem	-	Cef	1012.7	1	1	1	0	0	0			
A186	Lagoa -Barragem	-	Hep	954.6	1	1	1	0	0	0			
A187	Lagoa -Barragem	-	Hep	592.7	1	1	1	0	0	0			
A188	Lagoa -Barragem	-	Hep	171.7	1	1	1	0	0	0			
A189	Lagoa -Barragem	-	Hep	431.9	1	1	1	0	0	0			
A190	Lagoa -Barragem	-	Hep	75.7	1	1	1	0	0	0			
A191	Lagoa -Barragem	-	Cef	751.1	1	1	1	0	0	0			
A192	Lagoa -Barragem	-	Cef	1309.1	1	1	1	0	0	0			
A193	Lagoa -Barragem	-	Cef	1355.6	1	1	1	0	0	0			
A194	Lagoa -Barragem	-	Cef	1000	1	1	1	0	0	0			
A195	Lagoa -Barragem	-	Cef	1298.4	1	1	1	0	0	0			
A196	Lagoa -Barragem	-	Hep	782.8	1	1	1	1	1	1	0	0	0
A197	Lagoa -Barragem	-	Hep	924	1	1	1	0	0	0			
A198	Lagoa -Barragem	-	Hep	448.9	1	1	1	0	0	0			
A199	Lagoa -Barragem	-	Hep	717.7	1	1	1	0	0	0			
A200	Lagoa -Barragem	-	Hep	1172.1	1	1	1	0	0	0			

A201	Lagoa -Barragem	+	Cef	385.7	1	1	1				0	0	0
A202	Lagoa -Barragem	+	Hep	436.1	1	0	1				0	0	0
A203	Lagoa -Barragem	+	Cef	476.9	1	1	1				0	0	0
A204	Lagoa -Barragem	+	Hep	216.2	1	1	1				0	0	0
A205	Lagoa -Barragem	+	Cef	316.5	1	1	1				S h	0	0
A206	Lagoa -Barragem	+	Hep	207.9	1	1	1				0	S h	0
A207	Lagoa -Barragem	+	Cef	358.4	1	1	1				S h	0	S h
A208	Lagoa -Barragem	+	Hep	177.3	1	1	1				0	0	0
A209	Lagoa -Barragem	+	Cef	456.9	1	1	1				0	0	0
A210	Lagoa -Barragem	+	Hep	412	1	1	1				0	0	0

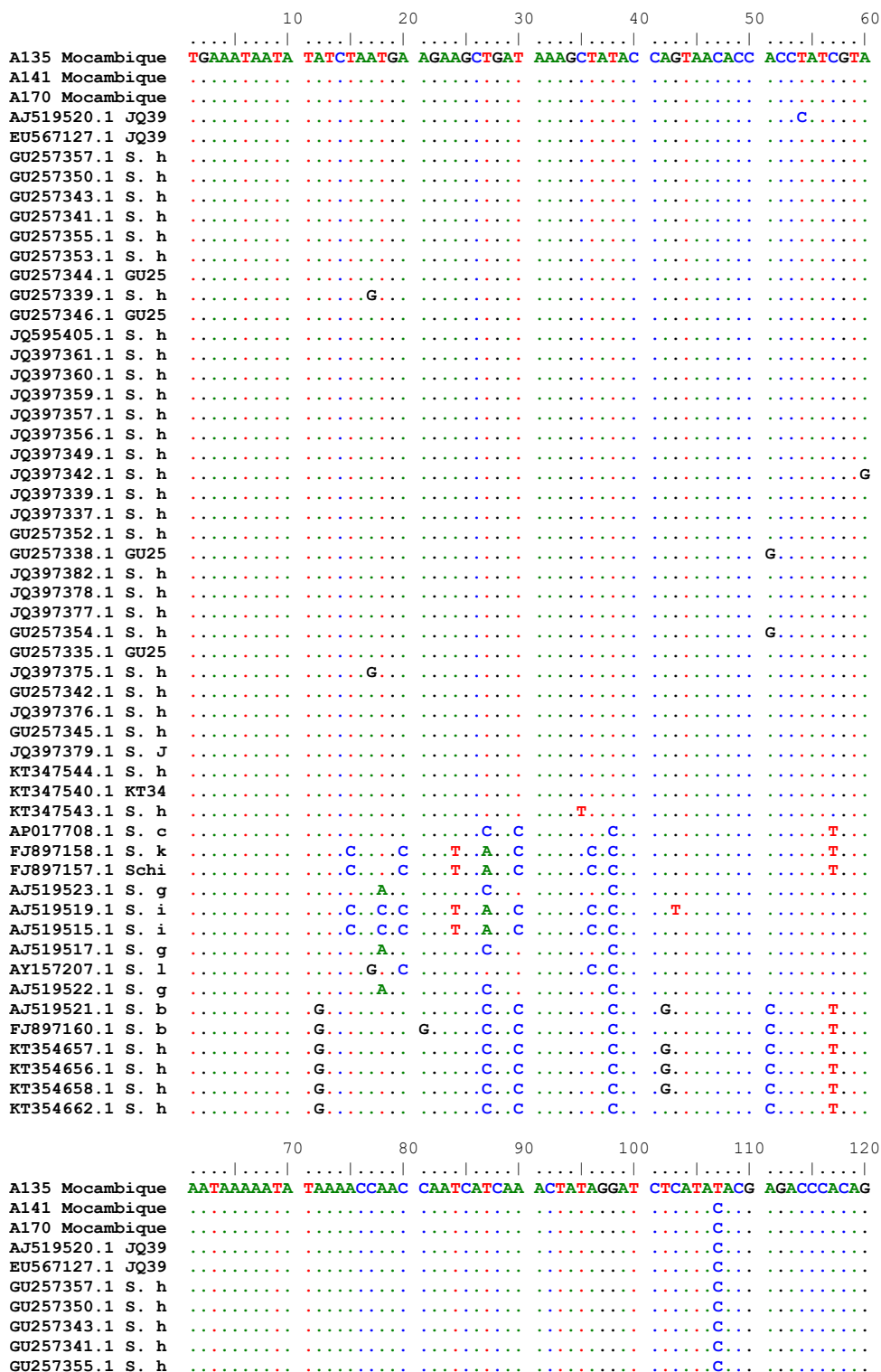
Legenda: Cef – cefalopodal; Hep – Hepatopâncreas; Dra I: 1º, 2º, 3º– Repetição da detecção do parasita; Sh – *S. haematobium*; 1 – Positivo e 0 - Negativo

Anexo 2**Tabela 5.** Resumo dos principais resultados

Local da Colheita	Região do caracol	DNA Total	Positivos PCR <i>Bulinus</i> ITS	Negativo PCR <i>Bulinus</i> ITS	Positivo PCR <i>Bulinus</i> COI	Negativo PCR <i>Bulinus</i> COI	Positivos PCR <i>Schistosoma</i> Dra1	Negativos PCR <i>Schistosoma</i> Dra1	PCR Multiple x COI	Nested PCR Multiplex COI
Rio Mutxora	Cefalopodal	50	50	0	50	0	0	50		
	Hepatopâncreas	50	48	2	45	5	0	50		
Lagoa - Barragem	Cefalopodal	55	55	0	55	0	14	41	15	10
	Hepatopâncreas	55	49	6	55	0	4	51	2	2
Total		210	202	8	205	5	18	192	17	12

Anexo 3

Figura 19. Alinhamento das sequências de COI obtidos durante o decurso deste projeto em relação as sequências depositadas no GenBank, em Bioedit



GU257353.1	S. h	T.....	C.....
GU257344.1	GU25	C.....
GU257339.1	S. h	C.....
GU257346.1	GU25	C.....
JQ595405.1	S. h	C.....
JQ397361.1	S. h	C.....
JQ397360.1	S. h	C.....	T.....
JQ397359.1	S. h	C.....
JQ397357.1	S. h	C.....
JQ397356.1	S. h	C.....
JQ397349.1	S. h	C.....
JQ397342.1	S. h	C.....
JQ397339.1	S. h	C.....
JQ397337.1	S. h	C.....
GU257352.1	S. h	C.....
GU257338.1	GU25	C.....
JQ397382.1	S. h	C.....	G.....
JQ397378.1	S. h	C.....
JQ397377.1	S. h	C.....
GU257354.1	S. h	C.....
GU257335.1	GU25	C.....	A.....
JQ397375.1	S. h	C.....
GU257342.1	S. h	C.....	A.....
JQ397376.1	S. h	C.....	G.....
GU257345.1	S. h	C.....
JQ397379.1	S. J	C.....
KT347544.1	S. h	C.....
KT347540.1	KT34	C.....
KT347543.1	S. h	T.....	C.....
AP017708.1	S. c	C.....	C.....	C.....	T.....	A.....	AG.....	TA.....
FJ897158.1	S. k	T.....	T.....	T.....	AC.....	AG.....	T.....
FJ897157.1	Schi	T.....	T.....	T.....	AC.....	AG.....	T.....
AJ519523.1	S. g	C.....	C.....	C.....	T.....	AC.....	AG.....	T.....
AJ519519.1	S. i	T.....	C.....	C.....	GC.....	AG.....	T.....
AJ519515.1	S. i	T.....	C.....	C.....	GC.....	AG.....	T.....
AJ519517.1	S. g	C.....	C.....	C.....	T.....	AC.....	AG.....	T.....
AY157207.1	S. l	T.....	T.....	A.....	AG.....	TT.....
AJ519522.1	S. g	C.....	C.....	C.....	T.....	AC.....	AG.....	T.....
AJ519521.1	S. b	C.....	C.....	C.....	T.....	AC.....	AG.....	TA.....
FJ897160.1	S. b	C.....	C.....	C.....	T.....	AC.....	AG.....	TA.....
KT354657.1	S. h	C.....	C.....	C.....	T.....	AC.....	AG.....	TA.....
KT354656.1	S. h	C.....	C.....	T.....	AC.....	AG.....	TA.....
KT354658.1	S. h	C.....	C.....	C.....	T.....	AC.....	AG.....	TA.....
KT354662.1	S. h	C.....	C.....	C.....	T.....	A.....	AG.....	TA.....
130 140 150 160 170 180									
A135 Mocambique		CTTTTAAGCA	TATATAATCA	AGAAAAAAC	TTTATACCTG	TAGGAATCCC	TATAATCATA		
A141 Mocambique			
A170 Mocambique			
AJ519520.1	JQ39		
EU567127.1	JQ39	C.....		
GU257357.1	S. h	C.....		
GU257350.1	S. h	G.....		
GU257343.1	S. h		
GU257341.1	S. h		
GU257355.1	S. h		
GU257353.1	S. h		
GU257344.1	GU25	C.....		
GU257339.1	S. h	C.....		
GU257346.1	GU25		
JQ595405.1	S. h		
JQ397361.1	S. h		
JQ397360.1	S. h		
JQ397359.1	S. h		
JQ397357.1	S. h		
JQ397356.1	S. h		
JQ397349.1	S. h		
JQ397342.1	S. h		

JQ397339.1	S. h	A.....
JQ397337.1	S. h	T.....
GU257352.1	S. h
GU257338.1	GU25
JQ397382.1	S. h	A.....
JQ397378.1	S. h
JQ397377.1	S. h	C.....
GU257354.1	S. h
GU257335.1	GU25
JQ397375.1	S. h	C.....
GU257342.1	S. h
JQ397376.1	S. h	A.....
GU257345.1	S. h
JQ397379.1	S. J
KT347544.1	S. h
KT347540.1	KT34
KT347543.1	S. h
AP017708.1	S. c	C.....	C.....	G.....	T.....	T.....
FJ897158.1	S. k	C.....	C.....	C.....	A.....	C.....	A.....	C.....
FJ897157.1	Schi	C.....	C.....	C.....	A.....	C.....	A.....	C.....
AJ519523.1	S. g	A.....	C.....	C.....
AJ519519.1	S. i	C.....	G.....	C.....	A.....	T.....	A.....	A.....
AJ519515.1	S. i	C.....	G.....	C.....	A.....	T.....	A.....	A.....
AJ519517.1	S. g	A.....	C.....	C.....
AY157207.1	S. l	A.....	G.....	C.....	A.....	T.....	A.....
AJ519522.1	S. g	A.....	C.....	C.....
AJ519521.1	S. b	C.....
FJ897160.1	S. b	C.....
KT354657.1	S. h
KT354656.1	S. h
KT354658.1	S. h
KT354662.1	S. h	C.....
		190	200	210	220	230	240	
A135 Mocambique		
A141 Mocambique		GTCAC	TGAAC	TAAAAA	TAT	AGCAG	TCAA	TAACT
A170 Mocambique	
AJ519520.1	JQ39
EU567127.1	JQ39
GU257357.1	S. h
GU257350.1	S. h
GU257343.1	S. h
GU257341.1	S. h	T.....
GU257355.1	S. h
GU257353.1	S. h
GU257344.1	GU25
GU257339.1	S. h
GU257346.1	GU25	G.....
JQ595405.1	S. h
JQ397361.1	S. h
JQ397360.1	S. h
JQ397359.1	S. h
JQ397357.1	S. h	A.....
JQ397356.1	S. h
JQ397349.1	S. h	G.....
JQ397342.1	S. h
JQ397339.1	S. h
JQ397337.1	S. h
GU257352.1	S. h	G.....
GU257338.1	GU25	G.....
JQ397382.1	S. h
JQ397378.1	S. h	G.....
JQ397377.1	S. h
GU257354.1	S. h	G.....
GU257335.1	GU25	G.....
JQ397375.1	S. h	G.....
GU257342.1	S. h	G.....
JQ397376.1	S. h

GU257345.1	S. hG.....A
JQ397379.1	S. JG.....A
KT347544.1	S. hA
KT347540.1	KT34A
KT347543.1	S. hA
AP017708.1	S. c	...A...T...C...G..G..A
FJ897158.1	S. kT.....A
FJ897157.1	SchiT.....A
AJ519523.1	S. g	..G..A...T.....A
AJ519519.1	S. iT.....A
AJ519515.1	S. iT.....A
AJ519517.1	S. g	..G..A...T..T...A
AY157207.1	S. l	...A...C..T...A
AJ519522.1	S. g	..G..A...T.....C..A
AJ519521.1	S. b	...A...T.....C.....G..A
FJ897160.1	S. b	...A...T..T...C.....G..A
KT354657.1	S. h	...A...T.....C.....G..A
KT354656.1	S. h	...A...T.....C.....G..A
KT354658.1	S. h	...A...T.....C.....G..A
KT354662.1	S. h	...G...G...T.....C.....G..A
		250 260 270 280 290 300
A135 Mocambique		GCTCAAACTA CACTTCCTAA GCAAACTATC GAAGCCATAG CACAAATCAA TCCATAATAC
A141 Mocambique	A
A170 Mocambique	A
AJ519520.1	JQ39A
EU567127.1	JQ39A
GU257357.1	S. hA
GU257350.1	S. hA
GU257343.1	S. hA
GU257341.1	S. hA
GU257355.1	S. hA
GU257353.1	S. hA
GU257344.1	GU25A
GU257339.1	S. hA
GU257346.1	GU25G.....A.....T.....A
JQ595405.1	S. h	A.....A.....T.....A
JQ397361.1	S. hA
JQ397360.1	S. hA
JQ397359.1	S. hA
JQ397357.1	S. hA
JQ397356.1	S. hA
JQ397349.1	S. hA
JQ397342.1	S. hA
JQ397339.1	S. hA
JQ397337.1	S. hA
GU257352.1	S. hG.....A.....T.....A
GU257338.1	GU25G.....A.....T.....A
JQ397382.1	S. hA
JQ397378.1	S. hA
JQ397377.1	S. hA
GU257354.1	S. hG.....A.....T.....A
GU257335.1	GU25G.....A.....T.....A
JQ397375.1	S. hG.....A.....T.....A
GU257342.1	S. hG.....A.....T.....A
JQ397376.1	S. hG.....A.....T.....A
GU257345.1	S. hG.....A.....T.....A
JQ397379.1	S. JG.....A.....T.....A
KT347544.1	S. hG.....A.....T.....A
KT347540.1	KT34G.....A.....T.....A
KT347543.1	S. hG.....A.....T.....A
AP017708.1	S. c	..C...A...A...T...C...T
FJ897158.1	S. k	..C...G...AA...T...T...T
FJ897157.1	Schi	..C...G...AA...T...T...T
AJ519523.1	S. g	A..C...A...A...T...G...T...T
AJ519519.1	S. i	..C...A...A...T...T...C...T
AJ519515.1	S. i	..C...A...A...T...T...C...T
AJ519517.1	S. g	..C...A...A...T...G...T...T

AY157207.1	S. l	A.....	A.....T.	G.....
AJ519522.1	S. g	A.C.....A.....	A.....T.....	G.....T.....
AJ519521.1	S. b	..C.....A.....	A.....T.....T.....T
FJ897160.1	S. b	..C.....A.....	A.....T.....T.....T
KT354657.1	S. h	..C.....A.....	A.....T.....T.....T
KT354656.1	S. h	..C.....A.....	A.....T.....T.....T
KT354658.1	S. h	..C.....A.....	A.....T.....T.....T
KT354662.1	S. h	..C.....A.....	A.....T.....T.....T
		310	320	330	340	350	360		
A135 Mocambique		CCAAACGATG	AATCATTATT	ACTTATCCTC	ATACATATAT	GACTAACTAT	TCCAAATCCA		
A141 Mocambique			
A170 Mocambique	C.....		
AJ519520.1	JQ39		
EU567127.1	JQ39		
GU257357.1	S. h		
GU257350.1	S. h		
GU257343.1	S. hT.....		
GU257341.1	S. h		
GU257355.1	S. hT.....		
GU257353.1	S. h		
GU257344.1	GU25		
GU257339.1	S. h		
GU257346.1	GU25		
JQ595405.1	S. h		
JQ397361.1	S. h		
JQ397360.1	S. h		
JQ397359.1	S. h		
JQ397357.1	S. h		
JQ397356.1	S. h		
JQ397349.1	S. h		
JQ397342.1	S. h		
JQ397339.1	S. h		
JQ397337.1	S. h		
GU257352.1	S. h		
GU257338.1	GU25		
JQ397382.1	S. h		
JQ397378.1	S. hC.....		
JQ397377.1	S. hC.....		
GU257354.1	S. h		
GU257335.1	GU25		
JQ397375.1	S. h		
GU257342.1	S. hT.....		
JQ397376.1	S. h		
GU257345.1	S. h		
JQ397379.1	S. J		
KT347544.1	S. h		
KT347540.1	KT34		
KT347543.1	S. h		
AP017708.1	S. cT.....G.....A.T.....G.....	A.....T
FJ897158.1	S. kT.C.....C.T.....	
FJ897157.1	SchiT.C.....C.T.....	
AJ519523.1	S. gT.....G.....A.T.....	A.....C
AJ519519.1	S. iT.C.....C.A.....	C.....	
AJ519515.1	S. iT.C.....C.A.....	C.....	
AJ519517.1	S. gT.....G.....A.T.....	A.....	
AY157207.1	S. lT.....A.....	C.....C.T
AJ519522.1	S. gT.....G.....A.T.....	A.....C
AJ519521.1	S. bT.....A.T.....	A.....T
FJ897160.1	S. bT.....A.T.....	A.....T
KT354657.1	S. hT.....A.T.....	A.....T
KT354656.1	S. hT.....A.T.....	A.....T
KT354658.1	S. hT.....A.T.....	A.....T
KT354662.1	S. hT.....A.T.....	A.....T
		370	380	390	400	410	420		
A135 Mocambique		GGTAAAA	TTA	AAACATACAC	CTCTGGATGA	CCAAAAATC	AAAA	TAAAGTG	CTGAAATAAT


```

A141 Mocambique .....
A170 Mocambique .....
AJ519520.1 JQ39 .....
EU567127.1 JQ39 .....
GU257357.1 S. h .....
GU257350.1 S. h .....
GU257343.1 S. h .....
GU257341.1 S. h .....
GU257355.1 S. h .....
GU257353.1 S. h .....
GU257344.1 GU25 .....G.....
GU257339.1 S. h .....G.....
GU257346.1 GU25 .....C.....
JQ595405.1 S. h .....
JQ397361.1 S. h .....T.....
JQ397360.1 S. h .....
JQ397359.1 S. h .....
JQ397357.1 S. h .....
JQ397356.1 S. h .....
JQ397349.1 S. h .....C.....
JQ397342.1 S. h .....
JQ397339.1 S. h .....
JQ397337.1 S. h .....
GU257352.1 S. h .....C.....
GU257338.1 GU25 .....C.....
JQ397382.1 S. h .....
JQ397378.1 S. h .....
JQ397377.1 S. h .....
GU257354.1 S. h .....C.....
GU257335.1 GU25 .....T..C.....
JQ397375.1 S. h .....
GU257342.1 S. h .....T..C.....
JQ397376.1 S. h .....
GU257345.1 S. h .....C.....
JQ397379.1 S. J .....C.....
KT347544.1 S. h .....
KT347540.1 KT34 .....T.....
KT347543.1 S. h .....
AP017708.1 S. c ..C.....C.....C.....A.....C
FJ897158.1 S. k .....G.....T..A.....T.....C.....C..A.....C
FJ897157.1 Schi .....G..C.....T..A.....T.....C.....C..A.....C
AJ519523.1 S. g ..C.....C.....G.....C.....C.....C.....A.....C
AJ519519.1 S. i .....C.....T..A.....C.....A.....G.....
AJ519515.1 S. i .....C.....T..A.....C.....A.....G.....
AJ519517.1 S. g ..C.....C.....G.....C.....C.....C.....A.....C
AY157207.1 S. l ..C.....C.....T..T..A.....C.....A.....
AJ519522.1 S. g ..C.....C.....G.....C.....C.....C.....A.....C
AJ519521.1 S. b ..C.G..C.....C.....C.....C.....A.....
FJ897160.1 S. b ..C.G..C.....A.....C.....C.....A.....
KT354657.1 S. h ..C.G..C.....C.....C.....C.....A.....
KT354656.1 S. h ..C.G..C.....C.....C.....C.....A.....
KT354658.1 S. h ..C.G..C.....C.....C.....C.....A.....
KT354662.1 S. h ..C.G..C.....C.....C.....C.....A.....

```

```

                                430      440      450
A135 Mocambique  ....|....| ....|....| ....|....| ....
A141 Mocambique  .....
A170 Mocambique  .....
AJ519520.1 JQ39  .....
EU567127.1 JQ39  .....
GU257357.1 S. h  .....
GU257350.1 S. h  .....
GU257343.1 S. h  .....
GU257341.1 S. h  .....
GU257355.1 S. h  .....T.....
GU257353.1 S. h  .....
GU257344.1 GU25  .....
GU257339.1 S. h  .....

```